

Aus dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie
und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

**Gegenseitige, synergistische Beeinflussung
von Vitamin D-Metaboliten
am rachitischen Hühnerküken**

Bernd Wicklein



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554808_0112

Aus dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie
und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Gegenseitige, synergistische Beeinflussung von Vitamin D-Metaboliten am rachitischen Hühnerküken

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Bernd Wicklein

aus

Neustadt bei Coburg

München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. H. Zucker

Korreferent: Prof. Dr. K. Walser

Tag der Promotion: 25. Juli 1986

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.....1
2	LITERATURÜBERSICHT.....5
2.1	Vitamin D_3 -Stoffwechsel.....5
2.2	Regulation des Vitamin D_3 -Stoffwechsels und der Calciumhomeostase.....8
2.3	Wirkung von Vitamin D_3 und seinen wichtigsten Metaboliten.....11
2.3.1	1,25(OH) D_3 und sein synthetisches Analogon $1\alpha(OH)D_3$11
2.3.2	24,25(OH) D_3 und $1,24,25(OH)_3 D_3$14
2.4	Kombinierte Verabreichung von D_3 -Metaboliten.....18
2.5	Das Modell der strontiuminduzierten Rachitis.....19
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN.....20
3.1	Tiermaterial.....20
3.2	Tierhaltung.....20
3.3	Versuchsdurchführung.....21
3.4	Futterzusammensetzung und -zubereitung.....26
3.5	Probeentnahme und Bestimmungsmethoden.....31
4	VERSUCHSBESCHREIBUNG UND ERGEBNISSE.....35
4.1	Kurative Testreihe.....35
4.2	Prophylaktische Testreihe.....63
5	DISKUSSION.....76
6	ZUSAMMENFASSUNG.....83
	SUMMARY.....85
7	LITERATURVERZEICHNIS.....87

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Skelettfunde zeigen, daß Menschen schon in prähistorischer Zeit unter Vitamin D-Mangelkrankheiten zu leiden hatten (IVANHOE, 1970). Während der Industriellen Revolution in Europa und Amerika erkrankte ein großer Teil der Arbeiter und ihrer Familien an Osteomalazie beziehungsweise Rachitis. Man schätzt, daß um die Jahrhundertwende etwa 80% der Arbeiterkinder in Boston an Rachitis erkrankt waren (EBRAHIM, 1979).

Erst 1922 wurde ein Vitamin als antirachitischer Faktor im Kabeljauleberöl durch McCollum entdeckt (McCOLLUM et al., 1922). WINDAUS gelang 1936 die Isolierung und chemische Identifizierung von Vitamin D₃ (WINDAUS et al., 1936). Ein neues Kapitel der Vitamin D-Forschung wurde von LUND und DeLUCA aufgeschlagen, als sie feststellten, daß zum Erreichen der biologischen Aktivität Vitamin D₃ erst im Stoffwechsel metabolisiert werden muß (LUND and DeLUCA, 1966). Mittlerweile sind mehr als 20 verschiedene Metabolite in vivo nachgewiesen. Außer 25(OH)D₃, 1,25(OH)₂D₃ und 24,25(OH)₂D₃ wird den meisten Molekülen allgemein nur eine katabole Rolle mit geringer biologischer Wirkung zugesprochen (NORMAN et al., 1982; DeLUCA and SCHNOES, 1983). Die Niere nimmt als Ort der 1 α -Hydroxylierung im Vitamin D₃-Stoffwechsel eine Schlüsselstellung ein (FRASER and KODICEK, 1970).

Nach KRUSE gibt es heute in der Humanmedizin zwei Indikationen für den Einsatz von Vitamin D und dessen Abkömmlinge (KRUSE, 1985). Dies sind Hypocalcämie und Knochenmineralisationsstörungen mit und ohne sekundären Hyperparathyreoidismus. Einer Prophylaxe mit Vitamin D₃ bedürfen alle Personen, die nicht einer ausreichenden Ultraviolettstrahlung ausgesetzt sind oder die einen erhöhten Bedarf haben. Der Bedarf steigt während der Zeit des Wachstums, der Schwangerschaft oder der Laktation. Die Differentialdiagnose des Symptoms der Hypocalcämie reicht von chronischer Niereninsuffizienz,

Malabsorptionssyndrom, Hypoparathyreoidismus, Vitamin D-Mangel bis zur akuten Pankreatitis und Infusion calciumbindender Substanzen (KRUSE und KUHLENCORDT, 1982). Für die Wahl der Therapie bei den klinisch bedeutsamsten Osteomalazieformen spielt die Ätiologie eine entscheidende Rolle. Nach KRUSE und KUHLENCORDT (1980) lassen sich diese Knochenmineralisationsstörungen in einen Vitamin D-Mangel, D_3 -Stoffwechselstörungen und renale, tubuläre Funktionsstörungen einteilen.

Die Ursachen für einen Vitamin D-Mangel sind bei einer unzureichenden Ultraviolettbestrahlung, einer ungenügenden Vitamin D-Zufuhr, Malabsorption oder Maldigestion zu suchen. Die D-Stoffwechselstörungen können die Bildung von $25(OH)D_3$ oder von $1,25(OH)_2D_3$ betreffen. Medikamentöse Ursachen, etwa die Verabreichung von Antiepileptika, und Lebererkrankungen hemmen oder verhindern die Synthese von $25(OH)D_3$. Chronische Niereninsuffizienz und hereditäre Pseudomangelrachitis Typ I hingegen bedingen eine Bildungsstörung von $1,25(OH)_2D_3$. Phosphatdiabetes und renale, tubuläre Acidose stellen die Formen der renalen, tubulären Funktionsstörungen dar.

Während die meisten Formen der Hypocalcämie, der Mineralisationsstörungen und der renalen, tubulären Funktionsstörungen mit pharmakologischen Dosen von Vitamin D_3 behandelt werden können, bedarf es bei D_3 -Stoffwechselstörungen des Einsatzes bereits hydroxylierter Vitamin D_3 -Metabolite. Die Behandlung mit $1,25(OH)_2D_3$ zeigt gegenüber einer Behandlung mit Vitamin D_3 außerdem die Vorteile, daß es einen schnelleren Wirkungseintritt hervorruft, eine kürzere Halbwertszeit besitzt und die individuelle Dosis leichter und rascher angepaßt werden kann (KRUSE, 1985). Es erfolgt keine Kumulation und Depotbildung. Das Hauptproblem liegt in der sehr geringen therapeutischen Breite und der damit verbundenen Intoxikationsmöglichkeit, da bei der Therapie mit $1,25(OH)_2D_3$ die Regulationsmöglichkeiten umgangen werden (FLURY und HALDIMANN, 1981). Ferner ist bei der Verwendung von 1α -hydroxylierten Metaboliten möglicherweise mit einer

beschleunigten Verschlechterung der Nierenfunktion zu rechnen (NIELSEN et al., 1980).

KANIS berichtet von Therapieversagern bei der Behandlung der Osteomalazie mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (KANIS et al., 1977). Bei Patienten mit der relativ häufigen Kombination von Vitamin D-Mangel, Hyperparathyreoidismus und daraus folgender Hypercalcämie würde eine Therapie mit Vitamin D_3 oder einem 1α -hydroxylierten Analog die Hypercalcämie nur noch verschlimmern (STANBURY, 1981).

Auch $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wird therapeutisch genutzt. SILVER berichtet von einer solchen Patientin, die unter der Behandlung mit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine dramatische, symptomatische Besserung ohne Anstieg der Serumcalciumwerte erfuhr (SILVER et al., 1984). Im Gegensatz dazu kann HODSMAN bei Patienten, die mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ keine Besserung zeigten, auch mit der Applikation von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ alleine keine Heilung erzielen. Mit der kombinierten Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erreicht er jedoch eine klinische Besserung und eine verbesserte Knochenmineralisation (HODSMAN et al., 1983).

Häufig wird in Arbeiten über eine mögliche, eigenständige Wirkung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ allein oder in Kombination die Frage aufgeworfen, ob $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ selbst oder erst nach einer weiteren Hydroxylierung zu $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ für eine biologische Aktivität verantwortlich zu machen ist (WALLING et al., 1977; SILVER et al., 1984). Um beurteilen zu können, ob die kombinierte Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ Vorteile in der Therapie und der Prophylaxe bringen kann, muß die Wirkung auf jedes Zielorgan einzeln untersucht werden.

Vorteilhaft gegenüber einer alleinigen Verabreichung wäre die Herabsetzung der benötigten Dosis für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Kombination, ein überadditiver Effekt auf die Calciumaufnahme im Darm bei gleichzeitig unteradditiver Wirkung auf die

Calciummobilisierung aus dem Knochen. Um die Intoxikationsgefahr herabzusetzen, wäre eine Verbesserung der therapeutischen Breite wünschenswert.

In meinen Untersuchungen wurde an Hühnerküken in einem kurativen und prophylaktischen Test die antirachitische Wirkung von Vitamin D-Metaboliten und deren Kombinationen auf den Darm geprüft. Es sollte geklärt werden, ob nach einer kombinierten Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, ebenso wie nach der Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ein synergistischer Wirkungsanstieg auf die Synthese des Calciumbindenden Proteins (CaBP) festgestellt werden kann, und ob dieser Anstieg durch $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder nach dessen 1α -Hydroxylierung durch $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ am Darm hervorgerufen wird. Um die Wirksamkeit von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit dessen synthetischen Analogon $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ zu vergleichen, wurde in einigen Versuchen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durch $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ ersetzt. Als wichtigster Parameter wurde das CaBP im Dünndarm bestimmt, ferner wurden der absolute und relative Knochenaschegehalt der Tibia, das Serumcalcium, die Gewichtsentwicklung, der Futterverzehr und die Futterverwertung ermittelt. Unter einem synergistischem oder überadditivem Effekt wird eine Wirkung verstanden, die noch über der Summe der Wirkungen der einzeln verabreichten Metabolite hinausgeht.

2 LITERATUROBERSICHT

Das Bild der Vitamin D-Forschung war in den letzten Jahren starken Änderungen unterworfen. Vitamin D₃ stellt keinen essentiellen Nahrungsbestandteil dar, sondern kann unter ultravioletter Lichteinstrahlung in der Haut synthetisiert werden. Es kann also definitionsgemäß nicht als wirkliches Vitamin angesprochen werden. Erst durch die veränderten Lebensbedingungen einer modernen Zivilisation, durch die zunehmende Luftverschmutzung in den Städten und durch den hauptsächlichlichen Aufenthalt der Menschen in Häusern, gewinnt Cholecalciferol mehr und mehr an Vitamincharakter. Es ist bekannt, daß Vitamin D₃ erst metabolisiert werden muß, bevor es seine biologische Aktivität entfalten kann. Da einige Metabolite der Definition eines Hormons entsprechen, kann Vitamin D₃ auch als Prohormon verstanden werden.

2.1 Vitamin D₃-Stoffwechsel

Vitamin D₃ wird entweder mit der Nahrung aufgenommen oder in der Haut selbst gebildet. Als natürlich vorkommende Nahrungsquellen dienen Eidotter, Milchfett und vor allem Fischleber und Fischleberöle. Zusammen mit den Fetten wird Vitamin D₃ im Dünndarm absorbiert und in den Lymphgefäßen abtransportiert. Bei der Absorption des in Chylomikronen gelösten Vitamins D₃ spielt die Galle eine wichtige Rolle (DUELAND et al., 1982). Jedoch werden 70-90% des sich im Körper befindlichen Vitamins D₃ unter natürlichen Bedingungen in der Haut produziert (FLURY und HALDIMANN, 1981).

Die Biosynthese vollzieht sich im Stratum germinativum. 7-Dehydrocholesterol bildet mit seinem Steroidgerüst die Ausgangssubstanz für die nicht-enzymatische, photolytische Reaktion. Die Energie wird durch Absorption der Wellenlängen 250-300 nm bereitgestellt; damit kann der B-Ring des Steroidgerüsts aufgespalten werden. Es entsteht Provitamin D₃, ein Secosteroid. Durch die anschließende thermische

Isomerisierung bilden sich Vitamin D_3 und seine Nebenprodukte Lumisterol₃ und Tachysterol₃ (HÖLLICK and CLARK, 1978). Cholecalciferol wird rasch an das D-bindende Protein (DBP) gebunden und gelangt so aus der Haut in den Kreislauf, wodurch eine gleichmäßige und stete Versorgung gewährleistet ist. DBP ist ein α -Globulin. Es bindet auch die anderen Metabolite von Vitamin D_3 , jedoch bevorzugt es $25(OH)D_3$ und Vitamin D_3 (BOUILLON and Van BAELEN, 1981).

Insgesamt sind nach der Synthese in der Haut und nach der Absorption im Darm etwa 80% des Vitamins an das DBP gebunden. So gelangt es in die Leber (HÖLLICK and DeLUCA, 1978), wo der erste Metabolisierungsschritt erfolgt. Vitamin D_3 wird am Kohlenstoffatom C(25) hydroxyliert. Die Hydroxylierung in der Leber zu $25(OH)D_3$ wird von mischfunktionellen Monooxygenasen katalysiert, die in den Mikrosomen und den Mitochondrien der Hepatozyten nachgewiesen werden konnten (BHATTACHARYA et al., 1974; PEDERSON et al., 1979; YOON and DeLUCA, 1980). Aus den Michaeliskonstanten läßt sich ableiten, daß das mikrosomale System das aktivere darstellt, welches spezifischer ist und bei niedrigen, physiologischen Konzentrationen arbeitet, (YOON and DeLUCA, 1980; DeLUCA, 1981). Die mikrosomale Monooxygenase setzt sich aus einem Flavoprotein (einer NADPH-abhängigen Cytochrom P-450Reduktase) und Cytochrom P-450 zusammen. In geringen Mengen erfolgt dieser Metabolisierungsschritt auch außerhalb der Leber in der Lunge, dem Darm und der Niere.

Das $25(OH)D_3$ gelangt an DBP gebunden in die Niere. Dort stellt es das Substrat für das Enzymsystem $25(OH)D_3$ - 1α -Hydroxylase dar. Das Enzymsystem besteht aus einem Flavoprotein, einem Eisen-Schwefel-Proteinkomplex (das renale Ferri-doxin) und Cytochrom P-450^{D1 α} . Das Cytochrom P-450^{D1 α} ist spezifisch für die 1α -Hydroxylase (HIWATASHII et al., 1982). Die 1α -Hydroxylierung durch die mitochondriale, mischfunktionelle Monooxygenase in den proximalen Tubuluszellen der Niere (BRUNETTE et al., 1978) stellt den wichtigsten Metabolisierungsschritt zu dem eigentlich stoffwechselaktiven

Metaboliten $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dar (DeLUCA, 1980). Aktivitäten der $25(\text{OH})\text{D}_3$ - 1α -Hydroxylase konnten außerhalb der Niere in Knochenzellkulturen (TURNER et al., 1980; HOWARD et al., 1981) im Placentagewebe des Menschen in vivo (GRAY et al., 1979) und der Ratte in vitro (TANAKA et al., 1979) nachgewiesen werden. Während die Placenta als extrarenaler Ort der 1α -Hydroxylierung nicht in Zweifel gezogen wird, scheint die Arbeit von REEVE et al. (1983) mit radioaktivmarkierten $25(\text{OH})\text{D}_3$ an nephrektomierten, nicht trächtigen Tieren anzudeuten, daß außerhalb der Niere und der Placenta unter physiologischen Bedingungen kein weiterer Syntheseort von biologischer Wichtigkeit besteht.

Weitere wichtige Metaboliten stellen $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ dar. Die 24-Hydroxylase ist eine mischfunktionelle Monooxygenase; sie ist NADPH-abhängig und benützt ein Cytochrom P-450 (HIWATASHII and DeLUCA, 1974). Neben der Lokalisation in den Mitochondrien der proximalen Tubuluszellen der Niere (KNUTSON and DeLUCA, 1974) wurde das Enzym auch im Darm (KUMAR et al., 1978) und Knorpel (GARABEDIAN et al., 1978) nachgewiesen. Während die 24-Hydroxylase im Knorpelgewebe offenbar eine größere Affinität zu $25(\text{OH})\text{D}_3$ besitzt, scheint die 24-Hydroxylase in der intestinalen Mukosa $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ als Substrat zu bevorzugen (KUMAR et al., 1978). Für $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ besteht zusätzlich noch der Syntheseweg über die 1α -Hydroxylierung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Niere (TANAKA et al., 1977). Während TANAKA für die Stellung der Hydroxylgruppe am Kohlenstoffatom C(24) die R-Konfiguration postuliert hatte (TANAKA et al., 1975), berichtet ISHIZUKA et al. (1984) von natürlich vorkommenden 24R- und 24S-Epimeren; allerdings dominiert 24R, $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ deutlich.

$25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurde im menschlichem Plasma (PARTRIDGE et al., 1981) und in Nierenzellkulturen von Küken (TANAKA et al., 1975) entdeckt. Auch $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ kann in vitro und in vivo isoliert werden (REINHARDT et al., 1981; TANAKA et al., 1981). Da nur eine relativ geringe biologische Aktivität

ermittelt wurde und $1,25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ nach Inkubation einer Nierenzellkultur mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ entdeckt werden konnte, wird eine exkretorische Funktion diskutiert (TANAKA et al., 1981).

Versuche mit ^{14}C markiertem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ an D-defizienten Tieren zeigen, daß innerhalb von 24 Stunden 30% der Radioaktivität als $^{14}\text{CO}_2$ über die Atmung ausgeschieden werden (KUMAR et al., 1976). Die oxydative Abspaltung der Seitenkette stellt offensichtlich einen wichtigen Abbauschritt dar. Ein wasserlöslicher Metabolit ist als "Calcitroic Acid" identifiziert worden (ESVELT et al., 1979). Seine Affinität zu den $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Rezeptoren ist äußerst gering; eine Wirkung an den Zielorganen Darm und Knochen ist nicht nachzuweisen, vermutlich handelt es sich um eine inaktivierete Form von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, die rasch über die Galle ausgeschieden wird (DeLUCA, 1980). Ein weiteres Inaktivierungsprodukt stellt $25(\text{OH})_2-26,23$ -Lakton dar. Es ließ sich im Plasma von Küken, Ratten, Schweinen und Menschen isolieren (WICHMAN et al., 1979; DeLUCA and SCHNOES, 1983). Die Synthese erfolgt über den Zwischenschritt $23\text{S},25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (NAPOLI et al., 1982). In der Galle, dem Hauptausscheidungs-
weg für Vitamin D-Metabolite, konnte KUMAR noch weitere Abbauprodukte identifizieren, die sich polar, wasserlöslich und anionisch zeigten (KUMAR et al., 1980). Die Verbindungen erwiesen sich als Sulfate und Glucosiduronate von Vitamin D_3 und seinen Metaboliten.

2.2 Regulation des Vitamin D_3 -Stoffwechsels und der Calciumhomeostase

Die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ als calciotropes Hormon setzt eine fein abgestimmte und effiziente Regulation der Konzentration im Serum voraus. Die regulierenden Kräfte können prinzipiell an zwei unterschiedlichen Stellen angreifen. Als Angriffspunkte bieten sich beide Hydroxylierungsschritte für eine Modifikation an. Ob dabei die 25-Hydroxylase in den Hepatozyten der Leber eine Rolle spielt, bleibt umstritten. Eine orale oder intravenöse Erhöhung der Vitamin D_3 - Gaben

bedingt einen Anstieg der $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Konzentration. Die Korrelation wird jedoch nur bis zu einer bestimmten Substratmenge aufrecht erhalten (MAWER, 1983). Hinweise auf eine direkte Produkthemmung konnten bisher nicht gefunden werden (BJORKHEM and HOLMBERG, 1979). Neuere Untersuchungen deuten aber an, daß $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Aktivität der 25-Hydroxylase in der Leber herabsetzt (NORMAN et al., 1984).

Hingegen stellt die 1α -Hydroxylase in der Niere den Angriffspunkt einer vielseitigen Regulation dar. Die wichtigste Kontrollfunktion üben der Calcium- und Phosphatspiegel im Blut, das Parathormon und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ selbst aus.

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ setzt die Aktivität der 1α -Hydroxylase herab, während es gleichzeitig stimulierend die 24-Hydroxylase beeinflusst (COLSTON et al., 1977; TRECHSEL et al., 1979). Da diese Wirkung durch Actinomycin D und α -Amanitin unterbunden wird, scheint die Hemmung der 1α -Hydroxylierung auf der Ebene der Translation stattzufinden (COLSTON et al., 1977).

Während einer hypocalcämischen Phase wird Parathormon sezerniert. Es besetzt Rezeptoren in Niere und Knochen, nicht jedoch im Darm (DeLUCA, 1974). In der Niere unterbindet es die Reabsorption von Phosphat aus dem Primärharn (RAISZ, 1981) und regt gleichzeitig das $25(\text{OH})\text{D}_3$ - 1α -Hydroxylase-System an (KREMER and GOLTZMAN, 1982). Eventuell beeinflusst es zusammen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Calciumreabsorption. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ fördert in Anwesenheit von Parathormon die Mobilisation von Calcium aus dem Knochen und steigert parathormonunabhängig den intestinalen Calciumtransport. Durch den dadurch bedingten Serumcalciumanstieg und davon unabhängig eventuell auch direkt durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wird die Ausschüttung des Parathormons mehr und mehr unterdrückt (KUGAI et al., 1981). Bei erhöhten Calciumwerten kann durch die Ausschüttung von Calcitonin aus den parafollikulären Zellen der Schilddrüse eine Gegenregulation eingeleitet werden. Serumcalcium hat somit einen großen Einfluß auf die Produktion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (DeLUCA, 1981); im hypercalcämi-

schen Zustand wird die 1α -Hydroxylierung unterdrückt, die 24-Hydroxylase stimuliert (HUGHES et al., 1975). Die Hypocalcämie vermag jedoch nur in Anwesenheit des Parathormons die 1α -Hydroxylase zu aktivieren, wie Versuche an Tieren mit entfernten Nebenschilddrüsen zeigen (GARABEDIAN, 1972).

Der Phosphatspiegel des Blutes beeinflusst ebenfalls den Vitamin D-Stoffwechsel. Die Konzentration von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ steigt während einer Phase der Hypophosphatämie und fällt bei hohen Phosphatwerten (HUGHES et al., 1975). Es wird eine direkt stimulierende Wirkung der Hypophosphatämie auf die 1α -Hydroxylase ohne Einwirkung des Parathormons erwogen (BAXTER and DeLUCA, 1976; DeLUCA and GHAZARIAN, 1980).

Die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration ist bei Säugetieren während der Trächtigkeit^{2,3} und der Laktation (HALLORAN et al., 1979; PIKE et al., 1979) und bei Vögeln während der Legeperiode stark erhöht (TANAKA, 1978). TRECHSEL berichtet von einem möglicherweise indirektem Effekt, da er nach Zugabe der Sexualhormone Östrogen, Progesteron und Testosteron zu Kükenzellkulturen keinen stimulierenden Effekt auf die 1α -Hydroxylase feststellen konnte (TRECHSEL et al., 1979). Die Ergebnisse von GALLAGHER lassen aber eher eine direkt regulierende Wirkung vermuten (GALLAGHER et al., 1980).

Noch weitaus widersprüchlicher ist der mögliche Zusammenhang zwischen Glukokortikoiden und Vitamin D. Hohe Serumwerte über längere Zeit oder Langzeitbehandlung mit Kortikoiden können einen starken Knochengewichtsverlust zur Folge haben. Neben der direkten Einwirkung auf Osteoblasten (SCHADT and BOWLER, 1978; DIETRICH et al., 1979) bewirken Kortikosteroide über einen von ihnen verursachten Abfall der Calciumabsorption einen Parathormonanstieg (FUCIK et al., 1975; Hahn et al., 1979). Die Ursache für die verminderte Calciumaufnahme aus dem Darm bleibt umstritten. Diskutiert wird eine geringere Synthese von $25(\text{OH})\text{D}_3$ (AVIOLI et al., 1968), eine herabgesetzte Bildung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (CHESNEY et al., 1978), eine inhibitorische Wirkung auf^{2,3} die Produktion eines

Trägerproteins (AVIOLI and HAHN, 1978) oder eine Interaktion am Zielorgan (HIRST and FELDMAN, 1982).

Weitere Faktoren, die möglicherweise einen Einfluß auf die Regulation ausüben könnten, stellen die Hormone Prolaktin (BICKLE et al., 1980), Calcitonin (KAWASHIMA et al., 1981), Insulin (HENRY, 1979) und das Wachstumshormon (SPANOS et al., 1978) dar, sowie außerdem noch Kalium (BIKLE and RASMUSSEN, 1978) und Hydrogenionen (REDDY et al., 1982).

2.3 Wirkung von Vitamin D_3 und seinen wichtigsten Metaboliten

Vitamin D_3 reguliert bei Vögeln, Säugetieren und eventuell noch bei anderen Wirbeltieren die Homeostase von Calcium und Phosphor. Ohne dieses Vitamin sinkt die Absorption von Calcium und Phosphor aus dem Nahrungsbrei stark ab, die Serumkonzentrationen fallen, als Folge können neuromuskuläre Störungen, Tetanien und schlaffe Lähmungen auftreten. Die Knochenmineralisation ist gestört, das Wachstum herabgesetzt oder sistiert ganz. Neben diesen klassischen Symptomen findet man aber auch Anämie, Myelofibrose (YETGIN and OZSOYLU, 1982), vermehrte Infektionsanfälligkeit und gestörte Phagozytose der Leukozyten (STRODER and KASAL, 1970).

2.3.1 $1,25(OH)_2D_3$ und sein synthetisches Analogon $1\alpha(OH)D_3$

$1,25(OH)_2D_3$ entspricht der klassischen Hormon-Definition. Die Niere 2^3 fungiert als endokrines Organ, über das Blut erreicht der Metabolit seinen Wirkungsort. Die Reaktionen, die durch diesen Metaboliten ausgelöst werden, entsprechen denen von Steroidhormonen. Steroidhormone entfalten ihre Wirkung durch Genmanipulation. Von ihnen beeinflusste Zellen zeichnen sich durch das Vorhandensein von spezifischen, hochbindungsfähigen Rezeptoren aus. Mittels des Hormon-Rezeptor-Komplexes gelangt das Hormon in den Kern, dort löst es die Transkription bestimmter Gene aus. Die synthetisierte m-RNA dient der Translation der für die biologische Antwort notwendigen Proteine (SOMJEN et al., 1983).

In Versuchen, die den Ort der Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aufhellen sollten, konnte bestätigt werden, daß sich der Metabolit zur Zeit der Wirkung in der Kernfraktion der intestinalen Epithelzelle (CHEN et al., 1970) und auch der Osteoblasten (WEBER et al., 1971) aufhält. Ober Rezeptoren für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wird jedoch nicht nur im Zytosol der typischen Gewebe, wie der Darmmukosa (WECKSLER et al., 1979), der Niere (SIMPSON et al., 1980) und dem Knochen (WALTERS et al., 1982) berichtet, es stellt sich vielmehr heraus, daß sich in einer Vielzahl von Geweben Rezeptoren nachweisen lassen. Bisher gelang der Nachweis in der Nebenschilddrüse (BRUMBAUGH et al., 1975), der Hypophyse (HAUSLER et al., 1980), dem Thymus (REINHARDT et al., 1982), dem Pankreas (CHRISTAKOS and NORMAN, 1979) und dem Milchdrüsengewebe (NARBAITZ et al., 1981).

Die Vorgänge am Darm sind am besten untersucht worden. Als Folge der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Einwirkung wird der Calcium- und der Phosphattransport im Darm drastisch erhöht. Die Calciumaufnahme hat einen biphasischen Charakter. Es wird von einer frühen (6-8 Stunden) und einer späten Phase (24-48 Stunden) berichtet. Bei dem ersten Resorptionsmaximum soll es sich um eine Antwort der Epithelzellen der Darmzotten nach vorhergehender Proteinsynthese handeln (FRANCESCHI and DeLUCA, 1981), während das zweite Maximum eine Antwort der Epithelzellen der Krypten darstellt (DeLUCA and SCHNOES, 1983). Der am besten meßbare Ausdruck einer Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ an der Dünndarmmukosa ist die Induktion des calciumbindenden Proteins (CaBP) (WASSERMAN et al., 1968). Der Gehalt der Mukosa an CaBP ist mit der Calciumabsorption gut korreliert. Die genaue Funktion des Proteins konnte noch nicht aufgeklärt werden. Die wahrscheinliche Aufgabe liegt in der Bindung des Calciums innerhalb der Zelle während des Transportes von der Bürstenzellmembran zu der Basalmembran. Toxische Konzentrationen könnten so innerhalb der resorbierenden Zellen vermieden werden (WASSERMAN and FULLMER, 1983). Während BISHOP et al. (1983) die Meinung vertritt, daß in seinem Testsystem vor der Calciumaufnahme (frühestens nach 4 Stunden) auf jeden Fall die Bildung von CaBP

induziert wurde (nach 2 Stunden), berichtet FULLMER et al. (1984) von einer Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Calciumaufnahme ohne vorherige Proteinsynthese. Jedoch wird kein Transport ins Blut beobachtet, sondern eine Akkumulation von Calcium im Gewebe. Die Veränderung der Phospholipidzusammensetzung der Bürstensaummembran wird in diesem Zusammenhang als weitere mögliche Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ genannt (RASMUSSEN et al., 1982; WASSERMAN et al., 1982). Die veränderte Lipidzusammensetzung könnte die passive Diffusion der Calciumionen erleichtern. Außerdem wird auch ein aktiver Transport durch die Bürstensaummembran diskutiert, dabei könnten membrangebundene calciumbindende Proteine eine Rolle spielen (KOWARSKI and SCHACHTER, 1981). Für die Basalmembran wird eine ATP-aktivierte Calciumpumpe vermutet (GHIJEN and Van OS, 1982). Die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Syntheseinduktion von Proteinen ist mit der Bildung von CaBP noch nicht zu Ende. Im Kükendarm konnte unter anderem noch eine Vitamin D-abhängige Ornithin Decarboxylase (SHINKI et al., 1985) und eine Spermidine N-Acetyltransferase (SHINKI et al., 1981) nachgewiesen werden, im Knochen die Alkalische Phosphatase (RODAN and RODAN, 1984) und das " γ -carboxyglutamic acid (gla) protein" (BERESFORD et al., 1984).

Wenig ist über die Wirkung am Knochen bekannt. Die Freisetzung von Calcium aus dem Knochen kann durch Actinomycin D unterbunden werden (TANAKA and DeLUCA, 1971), Proteinsynthese scheint also auch hier Voraussetzung zu sein. Eine Wirkung ist überhaupt nur in Gegenwart von Parathormon möglich. Man vermutet, daß $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ für einen Anstieg der Resorption durch Osteoklasten verantwortlich ist (RAISZ et al., 1972). Möglicherweise wird durch das Hormon eine Differenzierung der Osteoklasten aus Makrophagen provoziert und so der ständige, physiologische Umbau des Knochens gesteuert (TANAKA et al., 1982).

Aus der Vielzahl der Gewebe, in denen Rezeptoren für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gefunden wurden, läßt sich schließen, daß die Einflußnahme dieses Hormons nicht auf Darm, Knochen und

Niere beschränkt ist. Über die dort ausgeübte Funktion ist jedoch noch sehr wenig bekannt. Mit $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ steht ein synthetisch hergestelltes Analogon von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zur Verfügung. Es ist in therapeutischer Hinsicht von Bedeutung. Durch die Hydroxylgruppe am Kohlenstoffatom C(1) unterliegt es ebenfalls keiner Regulation in der Niere mehr.

2.3.2 $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$

BOYLE et al. (1973) berichteten erstmals über eine biologische Aktivität von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Seither konnte in allen Testsystemen in denen sich $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aktiv zeigte, ebenfalls eine Wirkung für $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nachgewiesen werden. Die benötigte Dosis für $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist abhängig vom System in dem gearbeitet wird, beträgt aber immer ein Vielfaches der Dosis für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (BOUILLON and Van BAELEN, 1981). Die bisher veröffentlichten Ergebnisse blieben jedoch widersprüchlich. Die Einschätzung dieses biologisch wichtigen Metaboliten, der unter normocalcämischen Bedingungen in relativ hoher Konzentration im Serum nachgewiesen werden kann, reicht vom katabolen Stoffwechselprodukt bis zur essentiellen Verbindung.

In Veröffentlichungen über $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ fallen zwei prinzipiell unterschiedliche Anschauungen auf, die vor allem von der Arbeitsgruppe um DeLUCA und derjenigen um NORMAN vertreten werden. Während NORMAN und seine Mitarbeiter die Auffassung vertreten, daß $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wichtige, eigenständige Wirkungen in physiologischer Weise im Organismus zukommen und seine Funktion nicht auf einen beginnenden Inaktivierungsschritt für Vitamin D-Verbindungen beschränkt ist, spricht die Gruppe um DeLUCA $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in physiologischen Konzentrationen jegliche Wirkung an den Zielorganen für Vitamin D ab. Nach Ansicht von DeLUCA reicht $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aus, um das ganze Spektrum der durch Vitamin D-bedingten Wirkungen abzudecken.

In unterschiedlichen Modellen wurde die biologische Bedeutung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ untersucht. Um eine mögliche

Hydroxylierung am Kohlenstoffatom C(24) auszuschließen, wurde die Verbindung 24,24-difluoro-25(OH) D_3 eingesetzt, an dessen Kohlenstoffatom C(24) zwei Fluoratome stabil gebunden sind. In Versuchen an Ratten zeigte sich, daß nach der Verabreichung von 24,24-difluoro-25(OH) D_3 im Vergleich zu 25(OH) D_3 keine Unterschiede bezüglich der Calciumabsorption im Darm, der Calciumresorption im Knochen und dem Serumphosphatspiegel festgestellt werden konnten (TANAKA, 1979; HALLORAN et al., 1981). Die Schlußfolgerung, daß eine 24-Hydroxylierung für den Wirkungseintritt nicht notwendig ist, konnte von anderen Autoren bestätigt werden, die diese Beobachtungen auch bezüglich Wachstum, Reproduktion (JARNAGIN et al., 1983) und Knochenwachstum bei Ratten (BROMMAGE et al., 1983) ergänzen konnten. PARFITT et al. (1984) folgerte deshalb, daß 1,25(OH) D_3 der einzige Metabolit ist, der notwendig und ausreichend für ein normales Knochenwachstum und eine normale Entwicklung bei der Ratte ist.

Andererseits gibt es eine ganze Reihe von Hinweisen für eine biologische Funktion von 24,25(OH) D_3 . Die ersten Hinweise darauf konnten durch Untersuchungen über die Schlupffähigkeit von Hühnerküken gefunden werden. Hennen, denen vom Zeitpunkt des Schlupfes an nur 1,25(OH) D_3 als einzige Vitaminquelle angeboten wurde, produzierten fruchtbare Eier. Die Embryonen entwickelten sich normal, es war ihnen jedoch unmöglich zu schlüpfen. Erst nachdem die Diät mit 24,25(OH) D_3 ergänzt wurde, konnte eine normale Schlupfrate erzielt werden (HENRY and NORMAN, 1978). Diese Beobachtung konnte bei der japanischen Wachtel bestätigt werden (NORMAN et al., 1983). Die niedrige Schlupfrate kann aber auch von 35-50% auf 90-100% heraufgesetzt werden, wenn die 1,25(OH) D_3 Diät mit 25(OH) D_3 ergänzt wird (AMEENUDIN et al., 1982). Da die Schlupfrate auch angehoben werden kann, indem man in die befruchteten Eier derart vorbehandelter Hennen verschiedene Vitamin D_3 -Verbindungen injiziert, vermuten DeLUCA and SCHNOES (1983) allein ein Transportproblem für 1,25(OH) D_3 in das Ei hinein, so daß die Notwendigkeit von 24,25(OH) D_3 für den Schlupf nur vorgetäuscht wird.

Gegen eine rein katabole Bedeutung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ spricht aber vor allem die Entdeckung von eigenen Rezeptoren für diesen Metaboliten. So finden sich in der Nebenschilddrüse, in Chondrozyten, im enchondralen Knochen und in Lymphozyten Rezeptoren (HENRY and NORMAN, 1984). NORMAN et al. (1982) betont neben den spezifischen Rezeptoren auch die eigenständige Wirkung, die sich qualitativ von der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Wirkung unterscheidet. Zu einer spezifischen Antwort auf $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zählt NORMAN neben einer normalen Schlupfrate aus befruchteten Eiern, die Wirkung auf den Knochen und den Einfluß auf die Nebenschilddrüse.

Am Darm bewirkt $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine Steigerung der Calciumabsorption. Es handelt sich wahrscheinlich um eine sehr kurzfristige Erhöhung. Die Antwort ist um den Faktor 10 bis 15 niedriger als bei $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ausgeprägt, dürfte aber von biologischer Signifikanz sein (KANIS et al., 1982).

$24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erniedrigt in pharmakologischen Dosen die Knochenresorption, selbst wenn diese durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ausgelöst wird. Es läßt sich das Erscheinungsbild der Rachitis verhindern, wenn auch die Knochenstruktur nicht ganz dem physiologischen Bild entspricht (TSANG et al., 1983). Der von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verursachte Absorptionsanstieg von Calcium im Darm hat keinen Anstieg von Serumcalcium oder der Calciumausscheidung im Urin zur Folge. Dies wird als Hinweis gewertet, daß eine Einlagerung in den Knochen gefördert wird. $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ scheint vor allem eine Wirkung auf die Knorpelzelle der Wachstumsfuge zu besitzen. In vitro konnte nachgewiesen werden, daß der Sulfateinbau in die Proteoglykane des Osteoids durch $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gesteigert werden kann (KANIS et al., 1982). GODMAN et al. (1984) vermutet eine Wirkung auf die Reifung und Mineralisation des Osteoids. Der Epiphysenfugenknorpel wird in jüngster Zeit sogar als Zielorgan für $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ angesprochen (FINE et al., 1985).

Auch bei der Nebenschilddrüse wird über eine eigene Funktion

für $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ diskutiert. Es soll für die normale Funktion mitverantwortlich sein und eine Hypertrophie verhindern helfen (NORMAN et al., 1982). Andere Autoren berichten jedoch, daß die Parathormonsekretion nur mit pharmakologischen Dosen herabgesetzt werden kann. Die Wirkung wäre dann nicht von physiologischer, aber von therapeutischer Bedeutung (KANIS et al., 1982).

Schon sehr früh tauchen in der Literatur Hinweise auf, daß $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Niere zu einem noch polareren Metaboliten umgewandelt werden kann, der eventuell erst dann für eine biologische Wirkung verantwortlich ist (BOYLE et al., 1973; HOLLICK et al., 1973; WALLING et al., 1976). Als Hinweis für eine biologisch notwendige 1 α -Hydroxylierung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wird das Phänomen gewertet, daß $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ seine antirachitische Wirkung verliert, sobald man es bei nephrektomierten Tieren anwendet (DeLUCA and SCHNOES, 1975). Auch bei chronischen Nierenerkrankungen kann die Calciumabsorption im Darm kaum nennenswert gesteigert werden (LLACH et al., 1980). Da außerdem die 24-Hydroxylase in der intestinalen Mukosa $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ als Substrat zu bevorzugen scheint (KUMAR et al., 1978), wird vermutet, daß am Darm eventuell nicht $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine Wirkung hervorruft, sondern $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$. Da jedoch $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine gesteigerte Retention von Calcium am Knochen auch bei Patienten ohne Nieren hervorzurufen vermag, wird deutlich, daß offensichtlich bei der Beurteilung, ob $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ für eine Wirkung verantwortlich zu machen ist, tierärztliche und organspezifische Unterschiede von Bedeutung sein können.

Es kann beim momentanen Stand der Forschung noch keine endgültige Entscheidung getroffen werden, ob $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ neben $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ von physiologischer Bedeutung ist. Wenn $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine biologische Aufgabe, die über eine katabole Funktion hinausgeht, zukommen sollte, bedarf es noch der Klärung, ob es selbst dafür verantwortlich gemacht werden kann, oder ob es eine Zwischenstufe zu einem anderen Metaboliten darstellt. Ein möglicher anderer Metabolit

könnte $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sein. Bei der Klärung dieser Frage kann das Modell der strontiuminduzierten Rachitis als Entscheidungshilfe dienen.

2.4 Kombinierte Verabreichung von Vitamin D_3 -Metaboliten

HENRY and NORMAN (1978) konnten berichten, daß aus Eiern von Legehennen nur dann Küken schlüpfen können, wenn diese vorher eine kombinierte Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erhalten haben. Auch für einen normalen Knochenstoffwechsel und für eine Normalisierung der Calciumhomöostase wird die Gabe beider Metabolite als Voraussetzung genannt (NORMAN et al., 1980). $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit seinem Einfluß auf den Knorpel und die Knochenmineralisation und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit seiner Wirkung auf die Resorption und den ständigen Umbau scheinen beide für die enchondrale Knochenentwicklung von großer Bedeutung zu sein (REDDI and WIENTROUB, 1985).

Die gemeinsame Gabe beider Metabolite soll jedoch nicht nur die Möglichkeit bieten, Reaktionen auszulösen, die sich qualitativ von der jeweiligen Einzelverabreichung unterscheiden, sondern es wird auch von sich ergänzenden, synergistischen Effekten berichtet.

So kann in vitro mit Hilfe des Parathormons und beider Metabolite ein direkt stimulierender, synergistischer Effekt auf die Knochenverkalkung erzielt werden (ENDO et al., 1980). In vivo können bei Hühnerküken bezüglich der Frakturheilung am Knochen mit der Kombination die besten Resultate erzielt werden, die noch die Ergebnisse der Vitamin D_3 -Gruppe übertreffen (DEKEL et al., 1983). Im Vergleich der therapeutischen, antirachitischen Wirkung beim Hühnerküken fanden BABARYKIN et al. (1982) ebenfalls einen steigernden Effekt bei gemeinsamer Verabreichung. Sowohl über kurative Fütterungsversuche am rachitischen Hühnerküken, als auch über einen Eischalentest an der japanischen Wachtel erschienen Publikationen, die von einem synergistischen Effekt von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ berichten (RAMBECK et al.,

1985; RAMBECK and ZUCKER, 1985). Ein synergistischer Effekt wird dabei als überadditive Wirkung verstanden, die deutlich über der Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ liegt und auch über die Summe der jeweiligen Einzelwirkungen hinausgeht.

2.5 Das Modell der strontiuminduzierten Rachitis

Calcium und Strontium sind beides Erdalkalimetalle; sie sind sich dabei chemisch recht ähnlich. Man glaubt, daß sich Strontium antagonistisch zu Calcium in der Absorption am Darm (CORRADINO and WASSERMAN, 1970) und in der Knochenmineralisation (SOBEL and REBER, 1935) verhält. Sie konkurrieren im Organismus. Die Symptome einer Strontiumvergiftung treten deshalb vor allem dort auf, wo eine relativ calciumarme Diät angeboten wird. Die Aufnahme von Strontium mindert die Calciumaufnahme, senkt dadurch den Serumcalciumspiegel und fördert das Entstehen rachitogener Knochenveränderungen (CORRADINO et al., 1971). Auch die Produktion von CaBP geht zurück.

OMDAHL and DeLUCA (1972) führten die strontiuminduzierte Rachitis auf eine unphysiologische Blockierung der 1α -Hydroxylierung in der Niere zurück. Der exakte Mechanismus dieser durch Strontium induzierten Hemmung der Hydroxylase in der Niere ist nicht bekannt. Man vermutet unter anderem eine indirekte Einflußnahme über das Parathormon und Calcitonin. Während Vitamin D_3 und $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Metabolite keinen Einfluß mehr auf die herabgesetzte Produktion von CaBP und die Calciumaufnahme ausüben können, wird die Synthese von CaBP auch bei einer strontiuminduzierten Rachitis dosisabhängig durch die Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder anderen 1-hydroxylierten Verbindungen verändert. Im Modell der strontiuminduzierten Rachitis werden Vitamin D-depletierten Tieren in einer calciumarmen Diät die zu untersuchenden Metabolite und ihre Kombinationen angeboten. Mit Hilfe des Parameters CaBP wird die Wirksamkeit am Darm überprüft.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die Wirkungen von Vitamin D_3 , seinen Metaboliten $1,25(OH)_2D_3$, $24,25(OH)_2D_3$, $1,24,25(OH)_3D_3$ und $1\alpha(OH)D_3$, sowie Kombinationen von $1,25(OH)_2D_3$ mit $24,25(OH)_2D_3$, $1,25(OH)_2D_3$ mit $1,24,25(OH)_3D_3$ und $1\alpha(OH)D_3$ mit $1,24,25(OH)_3D_3$ wurden an rachitischen Hühnerküken getestet. In drei kurativen und zwei prophylaktischen Versuchsreihen wurde die Aktivität der Metabolite und ihrer Kombinationen mit Hilfe der folgenden Parameter bestimmt: CaBP, absoluter und relativer Knochenaschegehalt der Tibia, Serumcalcium, Gewichtsentwicklung, Futterverzehr und Futterverwertung.

3.1 Tiermaterial

Im kurativen und prophylaktischen Test wurden männliche Broilerküken der Mastrasse "Lohmann, B 975" als Versuchstiere verwendet. Auf Grund ihres besseren Futterverzehrs und der damit verbundenen Frohwüchsigkeit sind Mastkükenhybriden anderen Küken leichterer Rassen in diesem Versuchsmodell weit überlegen. Bedingt durch den enormen Calcium- und Strontiumumsatz wirkt sich die biologische Potenz der verschiedenen Vitamin D-Verbindungen und der Kombinationen schon innerhalb weniger Tage deutlich aus. Da Östrogen einen Einfluß auf die Aktivität der $25(OH)D_3$ - 1α -Hydroxylase ausüben soll, sind in den hier beschriebenen Versuchen nur männliche Tiere eingesetzt worden.

3.2 Tierhaltung

Alle Versuche wurden in einem fensterlosen Stall mit etwa 28 m² Grundfläche durchgeführt. Fünf Leuchtstoffröhren mit 40 Watt Leistung sorgten für eine gleichmäßige Beleuchtung, die frei von ultravioletter Strahlung war. Als Wärmequelle dienten drei Elektroheizkörper. Zwei Wasserbehälter boten eine ausreichende Wasserverdunstung. Die Versuchskäfige mit etwa 0,5 m² Grundfläche und 30 cm Höhe wurden auf 70 cm hohen Holzgestellen entlang der Wände aufgestellt.

Die Einstreu der Kisten mit Torf ermöglichte eine gewisse Feuchtigkeits- und Geruchsbindung, die durch die Exkremente der Tiere entstand. Die Küken selbst wurden auf eingelegten Maschendrahtgittern gehalten. Zur Wasserversorgung wurden Automatiktränken mit Nippel eingesetzt. Sie sind Stülptränken überlegen, da sie eine gleichmäßige Versorgung mit frischem Wasser gewährleisten. Futter wurde in 7*7*37 cm großen Kunststofftrögen ad libitum dargeboten. Bei einer mittleren Luftfeuchtigkeit von 60% und einer Beleuchtung über 24 Stunden betrug die Raumtemperatur in Käfighöhe in der ersten Woche etwa 32 °C, um dann auf etwa 28 °C in der dritten Woche gesenkt zu werden.

3.3 Versuchsdurchführung

Der kurative Kükentest

Im kurativen Kükentest muß zwischen einer Vorperiode, in der Vitamin D-freies Alleinfutter verabreicht wurde, und einer Hauptperiode, die dem eigentlichen kurativen Teil mit dem Einsatz verschiedener Metabolite und Kombinationen entspricht, unterschieden werden.

Für die von der Brüterei angelieferten Eintagsküken begann sofort die Vorperiode mit dem Einsatz eines Vitamin D-depletierten Futters (Tabelle 1). Nach Ablauf einer 7-tägigen Vorperiode waren erste typische Symptome der Rachitis ausgeprägt; etwa unsicherer, schwankender Gang, vermehrtes Sitzen mit nach vorne gestreckten Ständern, gespreiztes Gefieder, beginnende Verkrümmung der Phalangen. Vor Beginn der Hauptperiode wurden die Küken mit Flügelmarken gekennzeichnet und gewogen. Die Einteilung in Versuchsgruppen geschah unter dem Aspekt, möglichst Gruppen mit einem mittlerem Gewicht und gleichem Verteilungsmuster zu erhalten. Extremgewichte wurden aussortiert. Die Gruppenverteilung innerhalb des Versuchsraumes war zufällig.

Mit Beginn der 7 - täglichen Hauptperiode wurde eine

Tabelle 1

Kurativer Kükentest

Vitamin D-freies Alleinfutter der Vorperiode

(0,99% Ca; 0,52% P)

Komponenten	%
Sojaschrot, fein	55,00
Native Maisstärke	31,26
Sojaöl, raff.	10,00
$\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,08
CaCO_3	1,50
NaCl	0,40
DL-Methionin	0,26
Vitamin- und Spurenelementvormischung	0,50
Gesamt	100,00

Tabelle 2

Kurativer Kükentest

Vitamin D-freies Alleinfutter der Hauptperiode (ohne Strontium)

(1,00% Ca; 0,51% P)

Komponenten	%
Sojaschrot, fein	52,00
Native Maisstärke	35,07
Sojaöl, raff.	9,00
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, reinst	1,00
CaCO_3	2,18
DL-Methionin	0,25
Vitamin- und Spurenelementvormischung	0,50
Gesamt	100,00

Tabelle 3

Kurativer Kükentest

Vitamin D-freies Alleinfutter der Hauptperiode (mit Strontium)

(0,40% Ca; 1,32% Sr; 0,51% P)

Komponenten	%
Sojaschrot, fein	52,00
Native Maisstärke	34,37
Sojaöl, raff.	9,00
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, reinst	1,00
CaCO_3	0,68
SrCO_3	2,20
DL-Methionin	0,25
Vitamin- und Spurenelementvormischung	0,50
Gesamt	100,00

Tabelle 4

Kurativer Kükentest

Vitamin- und Spurenelementvormischung

Menge, für den Zusatz zu einem kg Futter (Tabellen 1, 2, 3)
bei einem Anteil von 0,5% an der Diät.

Komponenten		mg
Retinol	(Vit. A)	1,50
Thiamin	(Vit. B ₁)	2,00
Nicotinsäure	(Vit. B ₂)	40,00
Ca-Pantothenat	(Vit. B ₂)	12,00
Riboflavin	(Vit. B ₂)	4,00
Pyridoxin	(Vit. B ₆)	2,00
Cyanocobalamin	(Vit. B ₁₂)	0,02
-DL-Tocopherolacetat	(Vit. E)	120,00
Vitamin K ₃		1,00
Cholinchlorid		1500,00
Fe-Fumerat		100,00
MnSO ₄ * H ₂ O		200,00
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O		200,00
Sojafeynmehl		ad 5000,00

Futterumstellung vorgenommen. Die Küken erhielten eine Diät entsprechend der Tabelle 2, sollte selektiv eine 1α -Hydroxylierung unterbunden werden, entsprechend der Tabelle 3. Die zu testenden Metabolite und ihre Kombinationen waren dem Futter der jeweiligen Gruppe bereits beigemischt. Am Ende der Versuchsperiode wurden die Tiere einzeln gewogen und zur Serumgewinnung eine Blutprobe entnommen. Nach der Tötung wurde außerdem für die Aschebestimmung ein Schenkel in Höhe der Femurdiaphyse abgesetzt und aus dem Duodenum für die CaBP-Bestimmung Darmschleimhaut gewonnen.

Der prophylaktische Kükentest

Im prophylaktischen Kükentest kamen ebenfalls Eintagsküken zum Einsatz. Die Küken wurden sofort nach ihrer Ankunft gewogen, in Gewichtsklassen eingeteilt und gruppiert. Auch hier sollten die Gruppen ein möglichst gleiches Durchschnittsgewicht und ein gleiches Verteilungsmuster aufweisen, Extremgewichte wurden aussortiert. Die Anordnung der Versuchsgruppen innerhalb des Stalles geschah rein zufällig. Die Küken bekamen 21 Tage lang eine halbsynthetische Diät gemäß Tabelle 5. Die Rationen erhielten gruppenspezifisch die Metabolite und ihre Kombinationen beigemischt. Am 10. Tag wurden die Küken mit Flügelmarken gekennzeichnet. Die Gewichtsentwicklung jedes einzelnen Tieres wurde am 10., 14., 17. und 21. Tag festgehalten. Am 22. Tag endete der Versuch. Die Probengewinnung gestaltete sich entsprechend wie im kurativen Test.

3.4 Futterzusammensetzung und -zubereitung

Im kurativen Kükentest

Vitamin D-freies Alleinfutter der Vorperiode:

Es fand ein Alleinfutter Verwendung, das in Tabelle 1 aufgelistet ist. Die Vitamin- und Spurenelementvormischung (Tabelle 4) enthält kein Vitamin D und auch keine Substanzen mit einer Vitamin D-artigen Wirkung. Dieses Futter bekamen

alle Küken während der ersten 7 Tage angeboten.

Vitamin D-freies Alleinfutter der Hauptperiode:

Einem Teil der Gruppen wurde Futter gemäß der Tabelle 2 gereicht. Die anderen Gruppen erhielten zur Verhinderung der 1α -Hydroxylierung in der Niere ein strontiumhaltiges und calciumarmes Futter gemäß Tabelle 3. Dieses Futter blieb bis zum Versuchsende bestehen.

Futterzusätze:

Die Vitamin- und Spurenelementvormischung wurde der Tabelle 4 entnommen und sowohl dem Alleinfutter der Vorperiode, als auch dem der Hauptperiode zugesetzt. Sie sind frei von Vitamin D und dessen Metabolite. In jeder Versuchsreihe befand sich eine D-freie Kontrollgruppe, die nur Futter gemäß Tabelle 2 oder 3 bekam. Für die restlichen Gruppen wurden definierte Mengen an Vitamin D_3 , seinen synthetischen Metaboliten oder deren Kombinationen unter das jeweilige Futter gemischt. Dazu wurden die Substanzen in einem Propan-diol-Äthanol-Gemisch (9:1) gelöst und äquimolar einem Teil des mit Petroläther (30°C - 50°C) gut befeuchteten Soja-schrotanteils der jeweiligen Gruppe untergemischt. Bei etwa 50°C wurde eine schonende Eintrocknung unter ständiger Durchmischung im Wasserbad ausgeführt. Zur Anwendung gelangte Vitamin D_3 , kristallin (Firma Merck, Art. Nr. 500936) und die synthetischen Metabolite $1\alpha(\text{OH})D_3$, $1,25(\text{OH})_2D_3$, $24,25(\text{OH})_2D_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3D_3$. Die synthetischen Verbindungen wurden freundlicherweise von Dr. W. WEISER, Firma HOFFMANN-La ROCHE AG, Basel zur Verfügung gestellt.

Im prophylaktischen Kükentest

Vitamin D-freies Alleinfutter (halbsynthetisch):

Im prophylaktischen Test stand über der ganzen Versuchspériode allen Küken ein bis auf die D-Verbindungen einheitliches Futter zur Verfügung. Die Zubereitung erfolgte gemäß Tabelle 5.

Tabelle 5

Prophylaktischer Kükentest

Vitamin D-freies Alleinfutter (halbsynthetisch)

(1,20% Ca; 0,70% P)

Komponenten	%
Purina (710 K)	22,00
Hefe (40% Protein)	2,00
L-Methionin	0,30
Glycin	0,30
Maiskleber	33,30
Dextrose (Cerulose)	28,00
Sojaöl	4,90
Cholinchlorid	0,15
Futterzusätze:	
Mineralstoffe	5,35
Spurenelemente	2,00
Vitamine	2,00
Gesamt	100,00

Tabelle 6

Prophylaktischer Kükentest

Futterzusätze

Mengen, für den Zusatz zu einem kg Alleinfutter (Tabelle 5) bei
bei einem Anteil von 5,35% Mineralstoffe, 2% Vitamine, 2% Spurenelemente

a) Mineralstoffe

Komponenten	in g
CaCO_3	15,00
CaHPO_4 (wasserfrei)	20,00
KH_2PO_4	11,00
NaCl	4,00
MgSO_4 ca. 3 H_2O	3,50
Gesamt	53,50

b) Spurenelemente

Komponenten	in mg
$\text{Fe(II)-Gluconat} * 2 \text{ H}_2\text{O}$	700,00
$\text{MnSO}_4 * \text{H}_2\text{O}$	170,00
ZnO	65,00
$\text{CuSO}_4 * 5 \text{ H}_2\text{O}$	20,00
$\text{NaMoO}_4 * 2 \text{ H}_2\text{O}$	5,00
KJ	0,70
$\text{CoCl}_2 * 6 \text{ H}_2\text{O}$	1,50
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 * 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,50
Sojafeynmehl	ad 20.000,00

Tabelle 6

Prophylaktischer Kükentest

Futterzusätze

Mengen, für den Zusatz zu einem kg Alleinfutter (Tabelle 5) bei
bei einem Anteil von 5,35% Mineralstoffe, 2% Vitamine, 2% Spurenelemente

c) Vitamine

Komponenten		in g
Retinol	(Vit. A)	1,50
Thiamin	(Vit. B ₁)	2,00
Nicotinsäure	(Vit. B ₂)	40,00
Ca-Pantothenat	(Vit. B ₂)	12,00
Riboflavin	(Vit. B ₂)	4,00
Pyridoxin	(Vit. B ₆)	2,00
Cyanocobalamin	(Vit. B ₁₂)	0,02
-DL-Tocopherolacetat	(Vit. E)	120,00
Vitamin K ₃		1,00
Sojafleinmehl		ad 20.000,00

Futterzusätze:

Die eingesetzten Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamine können Tabelle 6 entnommen werden. Das Alleinfutter wurde durch eine gruppenspezifische Beimengung an definierten Mengen von Vitamin D₃, seinen synthetischen Metaboliten und deren Kombinationen modifiziert. Das Beimengen der Substanzen geschah wie im kurativen Test beschrieben, anstatt in Sojaschrot wurden die Substanzen gleich in fertig gemischtes Futter nach Tabelle 5 eingemischt.

3.5 Probeentnahme und Bestimmungsmethoden

Gewichtsentwicklung

Im kurativen Test ließ sich die Gewichtsentwicklung aus der Gewichtsbestimmung zu Beginn und Ende der Hauptperiode ermitteln. Angegeben wird sie für jede Gruppe in "durchschnittliches tägliches Wachstum in Gramm pro Tier und Tag während der Hauptperiode". Entsprechend wurde im prophylaktischen Test verfahren. Bezug genommen wurde jedoch auf die ganze Versuchsdauer von 21 Tagen.

Futterverzehr und Futterverwertung

Aus dem Quotienten des verzehrten Futters in Gramm, der Anzahl der Küken und Versuchstage errechnet sich ein "durchschnittlicher Futterverzehr in Gramm pro Tier und Tag" der jeweiligen Gruppe. Bezug wird dabei wieder auf die Hauptperiode oder im prophylaktischen Test auf die ganze Versuchsperiode genommen. Für die Berechnung der Futterverwertung wird der Quotient aus dem verbrauchten Futter und der mittleren Zunahme während der Haupt- beziehungsweise Versuchsperiode gebildet. Man erhält als Wert "den Futterverbrauch in Gramm pro Gramm Zuwachs".

Serumgewinnung

Zur raschen Gewinnung von etwa 6 ml Blut wurde den mit der Hand fixierten Küken die Vena jugularis dexter mit Hilfe eines Skalpells eröffnet. Das Blut wurde in Serumröhrchen mit gerinnungsförderndem Granulat aufgefangen. Im Anschluß daran wurden die Küken sofort durch Genickschlag getötet. Nach vollständiger Gerinnung erfolgte die Zentrifugation 10 Minuten bei 1200 g. Nach dem Abpipettieren des Serums mittels Pasteurpipetten wurden die Einzelproben für die Calciumbestimmung durch Tiefgefrieren bei -20°C konserviert.

Serumcalciummessung

Nach Verdünnung der Proben mit einer 5% Lithiumchloridlösung 1:20 mit Hilfe eines Dual Diluters wurde die Serumcalciumbestimmung mit einem Eppendorf Flammenphotometer durchgeführt.

Knochenaschebestimmung

Für die Knochenanalytik fand in allen Versuchen die Tibia des rechten Laufes Verwendung. Hierfür wurde der rechte Schenkel in Höhe der Femurdiaphyse nach dem Töten der Küken abgetrennt, gruppenweise gesammelt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C konserviert. Nach etwa 20 Minuten Kochzeit konnten die Tibiae frei von Weichteilen, Sehnen und Knorpel gewonnen werden. Auf Vollständigkeit wurde streng geachtet, da sich in diesem Altersstadium die Epiphysen noch sehr leicht ablösen lassen. Nachdem die Knochen in Gruppen zusammengefaßt bis zur Gewichtskonstanz bei 100°C getrocknet waren, wurden sie zur Erfassung des Tibiatrockengewichtes gewogen. Die anschließende, vollständige Veraschung der Proben wurde bei 600°C im Muffelofen vollzogen. Nach dem Abkühlen im Exsikator konnte das Aschegewicht festgehalten werden. Die Angabe der Knochenasche erfolgte einerseits absolut, bezeichnet als "mittleres Aschegewicht der Tibia in Milligramm", andererseits relativ als "Aschegewicht der

Tibia relativ zum Knochentrockengewicht in Prozent", um eine Bezugsgröße zum Grad der Mineralisation des Knochens zu erhalten.

Bestimmung des Calciumbindenden Proteins (CaBP)

Nachdem ein direkter Zusammenhang zwischen Konzentration und Aktivität des CaBP's nachgewiesen werden konnte (WASSERMAN et al., 1968), zeigte NITSCHKE (1980) in einem Versuch an Hühnerküken, daß der Parameter CaBP-Aktivität anderen, wie Serumphosphat und Serumcalcium, bei der Beurteilung einer Vitamin D-Aktivität weit überlegen ist. Die Stimulation der CaBP-Synthese scheint eine primär hormonell bedingte, direkte Antwort auf $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu sein und wird nicht erst sekundär durch die Calciumaufnahme verursacht (BISHOP et al., 1983). Nach WASSERMAN and FULLMER (1983) ist die Induktion dieses Proteins auf molekularer Ebene der bestdefinierteste Ausdruck einer Wirkung von Cholecalciferol.

Herstellung des Schleimhauthomogenates

Das Homogenat wurde nach der Methode von CORRADINO and WASSERMAN (1971) hergestellt. Der absteigende Ast des Duodenums (10 cm lang) wurde den Küken sofort nach dem Töten entnommen, in eisgekühlter, physiologischer Kochsalzlösung gespült und entlang des Gekröseansatzes eröffnet. Um den Nahrungsbrei zu entfernen, wurde nochmals gespült und anschließend mittels eines Objektträgers die Mukosa vorsichtig abgeschabt. Die weitere Aufbereitung der Mukosa setzte sich aus Wiegen, Verdünnen mit der 6-fachen Menge an eisgekühlter Trispufferlösung (0,2 molar, pH 7,4) und Homogenisieren zusammen. Homogenisiert wurde mit einem Potter-Elektrjin-Homogenisator mit Teflonpistill. Die so vorbereitete Mukosa wurde 20 Minuten bei 38000 g und 3°C zentrifugiert, der Überstand 12 Minuten bei 60°C erhitzt und nochmals 10 Minuten bei 1200 g zentrifugiert. Im verbleibenden Überstand befinden sich nur noch hitzestabile Proteine, unter anderem auch das CaBP (TAYLOR and WASSERMAN, 1965).

Das fertige Homogenat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C tiefgefroren.

Gesamtproteinbestimmung

Das Gesamtprotein wurde nach der Methode von LOWRY (1951) bestimmt.

Die CaBP-Aktivität

Die modifizierte Nachweismethode nach WASSERMAN and TAYLOR (1966) macht sich die Calciumbindungsfähigkeit des CaBP's zunutze. Dabei wird die Konkurrenz zwischen dem zu bestimmenden CaBP und einem Kationenaustauscherharz (Chelex 100, Bio Rad Laboratories, 200-400 mesh) um eine festgesetzte Menge radioaktiven Calciums (^{45}Ca) ausgenutzt. Nach der Zugabe von 0,5 ml Chelex-Trispuffer-Suspension zu 1,0 ml Schleimhauthomogenat (4,5 g Chelex / 25 ml Trispuffer) und anschließender kurzer Durchmischung werden 0,1 ml $^{45}\text{CaCl}$ -Lösung (Amersham, 1 mCi / 200 ml Trispuffer) hinzugefügt und 15 Sekunden auf dem Vortexgerät gerührt. Durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 1600 g kann eine Abtrennung des Kationenaustauschers erreicht werden. 0,2 ml Überstand werden 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Unisolve I, Zinsser) in Zählfläschchen zugegeben und vermischt. Mittels β -Szintillationszähler (Flüßigkeitsszintillationszähler Packard TRI-CARB, Mod. 3385) läßt sich die Zerfallsrate bestimmen. Durch die Messung der Gesamtradioaktivität (0,1 ml $^{45}\text{CaCl}$ -Lösung + 0,1 ml Aqua dest. + 10 ml Szintillationsflüssigkeit) kann CaBP in "Prozent Radioaktivität der Probe bezogen auf die Gesamtradioaktivität" angegeben werden. Durch Multiplikation mit dem Faktor 8 erhält man die Korrektur auf 1 ml Schleimhauthomogenat. Durch Division mit dem Betrag Gesamtprotein der Probe (mg / ml Homogenat) erhält man schließlich "radioaktivmarkiertes CaBP in Prozent bezogen auf die Gesamtradioaktivität in einem Milliliter Schleimhauthomogenat pro Milligramm Gesamtprotein."

4 VERSUCHSBESCHREIBUNG UND ERGEBNISSE

In vorangehenden Untersuchungen hatte sich angedeutet, daß eine Kombination von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verglichen mit den einzelnen verabreichten Metaboliten eine Wirkungsverstärkung verursachte. Dieser Effekt zeigte sich in niedrigen Konzentrationsbereichen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und in Kombinationsverhältnissen von 1:10 bis 1:80 am stärksten (RAMBECK and ZUCKER, 1985).

4.1 Kurative Testreihe

Versuch I:

Ohne Strontiumhemmung der 1α -Hydroxylase:

Im ersten Versuch wurden die Verbindungen $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kombiniert. Der bereits früher nachgewiesene stimulierende Effekt von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ausgelöste Wirkung sollte bestätigt werden. Weiterhin sollte geklärt werden, ob sich $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ebenfalls stimulierend in der kombinierten Verabreichung verhält.

Neben einer Vitamin D-freien, negativen Kontrolldiät und einer positiven Kontrolle (20µg Vitamin D_3) wurden die Substanzen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (1,5µg), $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (15,0µg) und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ (10,0µg) eingesetzt (Alle Gewichtsangaben beziehen sich immer auf ein Kilogramm Futter). Das entsprach in der Kombination für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ einem Verhältnis von 1:10 und bei $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ von 1,5:10.

Versuchsanordnung	: kurativer Kükentest
Verabreichungsform	: oral
Vorperiode (Depletion)	: 7 Tage
Hauptperiode (kurative Phase)	: 7 Tage
Tierzahl pro Gruppe	: 10
Parameter	: Gewichtsentwicklung, Futter- verzehr, Futterverwertung, Serumcalcium, absoluter und relativer Knochenaschege- halt und CaBP

Ergebnisse:

Gewichtsentwicklung (Tab. 7)

Alle Gruppen zeigten eine stärkere Gewichtszunahme als die negative Kontrolle. Die beste Gewichtsentwicklung konnte bei den Kombinationen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$, sowie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ festgestellt werden. Beide lagen noch über der Zuwachsrate der Gruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Die Wirkung von $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ (10µg) überstieg diejenige von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und verursachte schon alleine denselben Zuwachs wie die positive Kontrolle und die Kombinationsgruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Futterverzehr und Futterverwertung (Tab. 8)

Der Verbrauch an Futter pro Tag und Tier während der Hauptperiode war bei den beiden Kombinationsgruppen am höchsten. Diese Werte lagen mehr als 20% über dem der negativen Kontrolle. Am besten vermochte die positive Kontrolle und die Kombinationsgruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ das Futter zu verwerten. Die D-freie Gruppe schnitt am schlechtesten ab.

Serumcalcium (Tab. 9)

Der größte Anstieg der Calciumwerte im Serum gegenüber der negativen Kontrolle konnte bei beiden Kombinationsgruppen

festgestellt werden. Auch die Serumcalciumwerte der Gruppen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, sowie $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ lagen noch über den Werten der positiven Kontrolle.

Absoluter und relativer Knochenaschegehalt (Tab. 10)

Die meiste Knochenasche in der Tibia ließ sich in der Gruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$, der Gruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und der Gruppe $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ finden. Relativ zum Trockengewicht fanden sich die höchsten Aschegehalte neben der positiven Kontrolle ebenfalls in den oben genannten Gruppen. Der deutlichste Anstieg der Knochenasche im Verhältnis zum Trockengewicht wurde in der Kombination $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ registriert. Der prozentuale Anteil der Knochenasche in der Trockensubstanz lag noch deutlich höher, als es die Summe der Einzelwirkungen erwarten ließ.

CaBP (Tab. 11)

$24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vermochte in einer Dosierung von $15,0\mu\text{g}$ die Aktivität von CaBP gegenüber der negativen Kontrolle nicht zu steigern ($p=0,001$). In der Kombination mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ konnte dagegen ein deutlicher Anstieg gegenüber der alleinigen Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verzeichnet werden ($p=0,001$). Der Wirkungsanstieg betrug mehr als 90%. Die kombinierte Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ermöglichte die höchste CaBP-Aktivität, jedoch erzielte schon die alleinige Gabe von $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ Werte, die über denjenigen der Kombination von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und nahe bei der positiven Kontrolle lagen.

Größere und eindeutige Unterschiede zwischen den Gruppen konnten nur für den Parameter CaBP gemessen werden. Für das CaBP konnte ein deutlicher, überadditiver Effekt für die Kombination $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gegenüber den einzeln verabreichten Metaboliten festgestellt werden. Die Wirkung dieser Kombination lag weit über der theoretischen

Summe der Einzelwirkungen ($p=0,001$). Auch in der Kombination $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ überstieg die CaBP-Aktivität die Werte 2_3 der Einzelkomponenten. $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in einer Konzentration von $10\mu\text{g}$ verursachte aber schon selbst eine Wirkung, die nahezu derjenigen der positiven Kontrolle entsprach. Ein additiver oder gar überadditiver Effekt der Wirkungen in der Kombination konnte also nicht mehr erwartet werden.

Bei den anderen Parametern waren prinzipiell die gleichen Tendenzen, wie bei den Ergebnissen der CaBP-Bestimmung zu erkennen. Die Unterschiede waren weniger gravierend, bei gleichzeitig relativ hoher Streuung der Einzelwerte; dennoch konnten für die Kombinationen immer höhere Werte, als für die einzeln verabreichten Metabolite ermittelt werden. Die Knochenasche erwies sich nach der CaBP-Aktivität als aussagekräftigster Parameter.

Mit Strontiumhemmung der 1α -Hydroxylase:

Mit Hilfe des Modells der strontiuminduzierten Rachitis sollte geklärt werden, ob der synergistische Effekt in Kombinationen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durch $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ selbst ausgelöst wird, oder ob er erst nach einer weiteren Hydroxylierung am Kohlenstoffatom C(1) ermöglicht wird.

In diesem Versuchsabschnitt wurde die gleiche Versuchsanordnung angewandt, wie im eben beschriebenen Teil ohne Strontiumhemmung der 1α -Hydroxylase. So wurden auch die gleichen Metabolite und Kombinationen in derselben Dosierung verwendet. Lediglich auf die Gruppe $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurde verzichtet, da $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ während einer gehemmten 1α -Hydroxylase in der Niere alleine keine Wirkung am Darm entfalten kann (DeLUCA and SCHNOES, 1975; LLACH et al., 1980). Es wurde deshalb vorausgesetzt, daß für $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Werte der negativen Kontrolle übernommen werden können.

Ergebnisse:

Es wurden die gleichen Parameter wie im ersten Versuch bestimmt. Es zeigte sich jedoch, daß für die Parameter Gewichtsentwicklung, Futterverzehr, Futterverwertung, Serumcalcium, absoluter und relativer Knochenaschegehalt keine interpretierbaren Abhängigkeiten zu den eingesetzten Metaboliten gefunden werden konnten. Während die Unterschiede zwischen den Gruppen nur sehr gering waren, konnte eine sehr große Streuung festgestellt werden. Die Werte der verschiedenen Parameter sind in den Tabellen für den ersten Versuchsabschnitt mit aufgeführt.

CaBP (Tab. 11)

Die größte CaBP-Aktivität konnte bei der Gruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gemessen werden, die kleinste bei der positiven und negativen Kontrolle. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und der Gruppe mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gefunden werden ($p=0,001$). Während $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ keinen signifikanten Anstieg gegenüber der negativen Kontrolle zu verzeichnen hatte ($p=0,001$), unterschied sich die Gruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ signifikant von der Gruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($p=0,01$).

Während einer durch Strontium bedingten Hemmung der 1α -Hydroxylase schien $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ keinen Einfluß auf die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auszuüben. In der Kombination mit $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ deutete sich ein stimulierender Effekt an. Der Unterschied zwischen der Gruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und der Gruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stellte sich zwar als signifikant heraus, war aber relativ gering ausgeprägt. Dies mag darin begründet liegen, daß $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in einer Dosierung eingesetzt wurde, die selbst noch keinen Anstieg der CaBP-Aktivität in diesem Versuchsmodell verursachte.

Tabelle 7

Kurativer Kükentest

Versuch I: Gewichtsentwicklung

(n = 10)

Gruppe	Diätzusatz pro kg Futter	tägliche Zunahme pro Tier	
		$\bar{x}$	$\pm s$
ohne Strontium			
1	D-freie Kontrolle	68,8	23,5
2	1,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$	95,4	11,7
3	15,0 μ g 24,25(OH) $_2$ D $_3$	89,6	13,8
4	1,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + 15,0 μ g 24,25(OH) $_2$ D $_3$	99,8	13,5
5	10,0 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	99,1	12,2
6	1,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + 10,0 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	105,5	15,6
7	20,0 μ g Vitamin D $_3$	102,9	11,7
mit Strontium			
8	D-freie Kontrolle	52,6	16,0
9	1,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$	58,1	14,0
10	1,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + 15,0 μ g 24,25(OH) $_2$ D $_3$	56,3	16,7
11	10,0 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	49,2	14,3
12	1,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + 10,0 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	60,7	9,2
13	20,0 μ g Vitamin D $_3$	58,1	8,0

Tabelle 8

Kurativer Kükentest

Versuch I: Futterverzehr (A) und Futterverwertung (B)

(n = 10)

Gruppe	Diätzusatz pro kg Futter	A in $\frac{g}{\bar{x}}$ pro Tier und Tag	B $\bar{x}$
ohne Strontium			
1	D-freie Kontrolle	23,2	2,35
2	1,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	27,0	1,99
3	15,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	26,2	2,04
4	1,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 15,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	28,6	2,00
5	10,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	26,3	1,95
6	1,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 10,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	28,5	1,88
7	20,0µg Vitamin D ₃	26,3	1,84
mit Strontium			
8	D-freie Kontrolle	19,9	2,63
9	1,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	21,4	2,58
10	1,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 15,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	20,6	2,58
11	10,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	19,0	2,71
12	1,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 10,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	22,7	2,60
13	20,0µg Vitamin D ₃	21,0	2,45

Tabelle 9

Kurativer Kükentest

Versuch I: Serumcalcium

(n = 10)

Gruppe	Diätzusatz pro kg Futter	mg / 100ml Serum $\bar{x}$	Serum $\pm s$
ohne Strontium			
1	D-freie Kontrolle	8,32	1,13
2	1,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	10,00	1,00
3	15,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	9,20	0,90
4	1,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 15,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	10,90	1,10
5	10,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	10,43	0,43
6	1,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 10,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	10,90	0,40
7	20,0µg Vitamin D ₃	9,73	0,70
mit Strontium			
8	D-freie Kontrolle	9,00	0,70
9	1,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	8,80	0,50
10	1,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 15,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	9,10	0,40
11	10,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	8,80	0,50
12	1,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 10,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	8,70	0,50
13	20,0µg Vitamin D ₃	8,90	0,30

Tabelle 10

Kurativer Kükentest

Versuch I: Absoluter und relativer Knochenaschegehalt

(n = 10)

Gruppe	Diätzusatz pro kg Futter	Knochenaschegehalt	
		in g $\bar{x}$	in % $\bar{x}$
ohne Strontium			
1	D-freie Kontrolle	0,139	29,3
2	1,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,198	33,7
3	15,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	0,188	30,6
4	1,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 15,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	0,219	39,3
5	10,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	0,209	38,3
6	1,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 10,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	0,228	39,3
7	20,0µg Vitamin D ₃	0,183	39,4
mit Strontium			
8	D-freie Kontrolle	0,086	21,2
9	1,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,101	21,8
10	1,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 15,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	0,097	23,0
11	10,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	0,092	23,1
12	1,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 10,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	0,097	22,8
13	20,0µg Vitamin D ₃	0,084	20,8

Tabelle 11

Kurativer Kükentest

Versuch I: CaBP

(n = 10)

Gruppe	Diätzusatz pro kg Futter	$\bar{x}$	$\pm s$
ohne Strontium			
1	D-freie Kontrolle	1,98	0,52
2	1,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$	5,00	0,80
3	15,0 μ g 24,25(OH) $_2$ D $_3$	2,30	0,40
4	1,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + 15,0 μ g 24,25(OH) $_2$ D $_3$	7,80	1,90
5	10,0 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	8,92	0,89
6	1,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + 10,0 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	11,20	1,70
7	20,0 μ g Vitamin D $_3$	9,86	2,40
mit Strontium			
8	D-freie Kontrolle	2,90	0,80
9	1,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$	3,60	0,40
10	1,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + 15,0 μ g 24,25(OH) $_2$ D $_3$	4,20	1,00
11	10,0 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	3,90	1,00
12	1,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + 10,0 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	5,00	1,00
13	20,0 μ g Vitamin D $_3$	2,60	0,60

Versuch II:

Ohne Strontiumhemmung der 1α -Hydroxylase:

Nachdem im ersten Versuch der synergistische Effekt von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in einer für den kurativen Test relativ niedrigen Dosierung und in einem Verhältnis von 1:10 ($1,0\mu\text{g} + 15,0\mu\text{g}$) bestätigt werden konnte, erwies sich die Dosierung für $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($10,0\mu\text{g}$) als zu hoch gewählt. Die CaBP-Aktivität entsprach der der positiven Kontrolle, so daß kein überadditiver Effekt zusammen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mehr erwartet werden konnte. Die Kombination $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ wurde deshalb im zweiten Versuch im Verhältnis 1:1 und 1:3 eingesetzt.

Eine D-freie Kontrollgruppe, eine Gruppe mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($1,5\mu\text{g}$), und zwei mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($1,5$ und $3,0\mu\text{g}$) wurden gebildet. Bei einer kombinierten Rationsgestaltung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ergab sich somit ein Verhältnis von 1:1 ($1,5\mu\text{g} + 1,5\mu\text{g}$), sowie von 1:2 ($1,5\mu\text{g} + 3,0\mu\text{g}$).

Versuchsanordnung	: kurativer Kükentest
Verabreichungsform	: oral
Vorperiode (Depletion)	: 7 Tage
Hauptperiode (kurative Phase)	: 7 Tage
Tierzahl pro Gruppe	: 11
Parameter	: Gewichtsentwicklung, Futterver- zehr, Futterverwertung, Serumcalcium, absoluter und relativer Knochenaschege- halt und CaBP

Ergebnisse:

Gewichtsentwicklung (Tab. 12)

Nur die Gruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($1,5\mu\text{g}$) und die beiden Kombinationsgruppen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ im Verhältnis 1:1 und 1:2 zeigten eine Steigerung in der täglichen Zuwachsrate. Bei beiden Gruppen mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($1,5\mu\text{g}$ und

3,0µg) entsprachen die Gewichtszunahmen denen der negativen Kontrolle.

Futtermittelverbrauch und Futtermittelverwertung (Tab. 13)

Der Futtermittelverbrauch erwies sich bei beiden Kombinationsgruppen am größten, gefolgt von der Gruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Von den Gruppen mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ konnte nur bei der höheren Dosierung ein geringfügiger Anstieg gegenüber der negativen Kontrolle registriert werden. Eine bessere Verwertung des Futtermittels konnte nur bei der alleinigen Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gefunden werden.

Serumcalcium (Tab. 14)

Die Gruppe mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und beide Kombinationsgruppen erreichten die höchsten Serumkonzentrationen an Calcium. Alle drei Gruppen lagen auf gleichem Niveau. Auch $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ vermochte mit beiden Konzentrationen (1,5µg und 3,0µg) den Serumcalciumspiegel leicht anzuheben.

Absoluter und relativer Knochenaschegehalt (Tab. 15)

Alle eingesetzten Metabolite und Kombinationen führten zu einem Anstieg des absoluten und relativen Knochenaschegehaltes. Im Vergleich des mittleren Aschegewichtes der Tibiae konnte am meisten Knochenasche bei der Gruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ (1,5µg + 3,0µg) gefunden werden. Auch die zweite Kombinationsgruppe mit einem Metabolitenverhältnis von 1:1 erreichte noch einen geringfügig höheren Wert, als die alleinige Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Auch $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ bewirkte in beiden Dosierungen einen geringfügigen Anstieg der Knochenasche. Der relative Anteil der Knochenasche an der Trockensubstanz erwies sich ebenfalls am höchsten bei den Gruppen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ in den Verhältnissen 1:2 und 1:1. Während $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gleichfalls noch einen deutlichen Anstieg des relativen Knochenaschegehaltes bewirken konnte, verursachte $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ in

den eingesetzten Dosierungen (1,5µg und 3,0µg) nur in geringem Maße einen Anstieg. In beiden Gruppen lag der Zuwachs des mittleren, prozentualen Knochenaschegehaltes noch über der Summe der durch die einzeln verabreichten Metabolite hervorgerufenen Wirkungen.

CaBP (Tab. 16)

Während 1,24,25(OH)₂D₃ (1,5µg und 3,0µg) keinen Anstieg der CaBP-Aktivität zur negativen Kontrolle bewirken konnte, wurde die Aktivität bei kombinierter Verabreichung gegenüber der alleinigen Gabe von 1,25(OH)₂D₃ erhöht (jeweils p=0,001). Bei der Gabe von 1,25(OH)₂D₃ und 1,24,25(OH)₂D₃ im Verhältnis 1:1 (1,5µg + 1,5µg) konnte ein Anstieg der CaBP-Aktivität um 125%, im Verhältnis 1:2 (1,5µg + 3,0µg) ein Anstieg um 140% gegenüber der durch einer alleinigen Gabe von 1,25(OH)₂D₃ (1,5µg) bewirkten Aktivitätssteigerung registriert werden.

Durch eine kombinierte Verabreichung von 1,25(OH)₂D₃ und 1,24,25(OH)₂D₃ konnte wie durch eine Kombination aus 1,25(OH)₂D₃ und 24,25(OH)₂D₃ ein überadditiver Effekt auf die Aktivitätssteigerung des CaBP's verursacht werden. Die synergistische Wirkung konnte bei niedriger Dosierung in einem Verhältnis von 1,25(OH)₂D₃ und 1,24,25(OH)₂D₃ von 1:1 und 1:2 gefunden werden. Ein deutlich stimulierender Effekt von 1,24,25(OH)₂D₃ auf die Wirkung von 1,25(OH)₂D₃ wurde auch bezüglich des relativen Knochenaschegehaltes registriert. Die Parameter Gewichtszunahme, Serumcalcium und absolute Knochenasche erbrachten für die Kombinationsgruppen ähnliche Werte, wie für 1,25(OH)₂D₃. Nur im Futterverbrauch und der Futterverwertung wurden höhere Werte festgestellt.

Mit Strontiumhemmung der 1α-Hydroxylase:

1,25(OH)₂D₃ in einer Dosierung von 1,5µg vermochte im Modell der strontiuminduzierten Rachitis die Aktivität von CaBP noch nicht zu steigern. Die relativ geringen Schwankungen

zwischen den unterschiedlichen Gruppen wurden als eine zu geringe Dosierung der Komponente $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in den Kombinationen interpretiert. Die Dosis für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurde deshalb in den Rationen verdoppelt.

Neben der negativen Kontrolle, einer Gruppe mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($3,0\mu\text{g}$) und einer Gruppe mit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($15,0\mu\text{g}$) wurde die Kombination $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($3,0\mu\text{g} + 15,0\mu\text{g}$) eingesetzt. Die Versuchsanordnung war entsprechend der im ersten Abschnitt des zweiten Versuches.

Ergebnisse:

CaBP (Tab. 16)

Zwischen den Werten der negativen Kontrolle, sowie der Gruppe mit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($15,0\mu\text{g}$) konnte für das CaBP kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0,001$). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($3,0\mu\text{g}$) steigert dagegen deutlich die Aktivität. Gegenüber der Gruppe mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($3,0\mu\text{g}$) konnte kein weiterer Anstieg durch eine kombinierte Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gemessen werden.

Um einen ähnlichen Aktivitätszuwachs des CaBP's im strontiuminduzierten Rachitismodell zu erhalten, wie in Versuchen ohne Strontiumhemmung der 1α -Hydroxylase, mußte die Dosis für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verdoppelt werden. Ein stimulierender Effekt auf die CaBP-Aktivität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ war in diesem Modell nicht nachweisbar.

Tabelle 12

Kurativer Kükentest

Versuch II: Gewichtsentwicklung

(n = 11)

Gruppe	Diätzusatz pro kg Futter	tägliche Zunahme pro Tier	
		$\bar{x}$	in g $\pm s$
ohne Strontium			
1	D-freie Kontrolle	79,0	16,7
2	1,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	94,4	5,9
3	1,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	81,1	8,6
4	3,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	81,1	6,3
5	1,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 1,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	90,7	8,4
6	1,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 3,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	92,7	9,9
mit Strontium			
7	D-freie Kontrolle	48,5	7,2
8	3,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	48,8	10,2
9	15,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	46,6	11,3
10	3,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 15,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	45,8	11,2

Tabelle 13

Kurativer Kükentest

Versuch II: Futterverbrauch (A) und Futterverwertung (B)

(n = 11)

Gruppe	Diätzusatz pro kg Futter	A in $\frac{g}{\bar{x}}$ pro Tier	B und Tag $\bar{x}$
ohne Strontium			
1	D-freie Kontrolle	24,1	2,14
2	1,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$	26,2	1,94
3	1,5 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	24,0	2,07
4	3,0 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	25,1	2,17
5	1,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + 1,5 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	27,9	2,15
6	1,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + 3,0 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	27,4	2,07
mit Strontium			
7	D-freie Kontrolle	20,0	2,88
8	3,0 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$	19,1	2,74
9	15,0 μ g 24,25(OH) $_2$ D $_3$	20,0	3,00
10	3,0 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + 15,0 μ g 24,25(OH) $_2$ D $_3$	19,5	2,98

Tabelle 14

Kurativer Kükentest

Versuch II: Serumcalcium

(n = 11)

Gruppe	Diätzusatz pro kg Futter	mg / 100ml Serum $\bar{x}$	$\pm s$
ohne Strontium			
1	D-freie Kontrolle	7,7	1,7
2	1,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$	9,7	1,2
3	1,5 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	8,2	0,8
4	3,0 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	8,4	1,0
5	1,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + 1,5 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	9,8	0,9
6	1,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + 3,0 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	9,9	1,5
mit Strontium			
7	D-freie Kontrolle	9,0	0,7
8	3,0 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$	8,6	0,8
9	15,0 μ g 24,25(OH) $_2$ D $_3$	8,8	0,7
10	3,0 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + 15,0 μ g 24,25(OH) $_2$ D $_3$	8,8	0,6

Tabelle 15

Kurativer Kükentest

Versuch II: Absoluter und relativer Knochenaschegehalt

(n = 11)

Gruppe	Diätzusatz pro kg Futter	Knochenaschegehalt	
		in g $\bar{x}$	in % $\bar{x}$
ohne Strontium			
1	D-freie Kontrolle	0,139	24,7
2	1,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,184	28,8
3	1,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	0,149	26,3
4	3,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	0,151	26,7
5	1,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 1,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	0,187	30,2
6	1,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 3,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	0,194	31,0
mit Strontium			
7	D-freie Kontrolle	0,090	18,5
8	3,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,097	20,2
9	15,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	0,092	19,2
10	3,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 15,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	0,090	19,2

Tabelle 16

Kurativer Kükentest

Versuch II: CaBP

(n = 11)

Gruppe	Diätzusatz pro kg Futter	$\bar{x}$	$\pm s$
ohne Strontium			
1	D-freie Kontrolle	1,9	0,4
2	1,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$	3,9	1,2
3	1,5 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	1,7	0,3
4	3,0 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	2,3	0,4
5	1,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + 1,5 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	6,4	1,4
6	1,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + 3,0 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	6,7	1,2
mit Strontium			
7	D-freie Kontrolle	1,9	0,2
8	3,0 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$	4,3	0,6
9	15,0 μ g 24,25(OH) $_2$ D $_3$	2,1	0,6
10	3,0 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + 15,0 μ g 24,25(OH) $_2$ D $_3$	4,1	1,5

Versuch III:

Ohne Strontiumhemmung der 1α -Hydroxylase:

Bisher konnte gezeigt werden, daß $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in einer Konzentration von $1,5\mu\text{g}$ und in einem Verhältnis von 1:1 und 1:2 mit $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kombiniert einen überadditiven Effekt auf das CaBP ausübt. In diesem Versuchsabschnitt sollte geklärt werden, wie niedrig die Dosis für die kombinierte Gabe angesetzt werden kann, ohne daß der synergistische Effekt verloren geht. Zusätzlich wurde $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ eingesetzt, um zu klären, ob $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in seiner Wirkung auf das CaBP ersetzen kann.

Zusammen mit einer negativen Kontrollgruppe kamen die Gruppen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($0,5\mu\text{g}$ und $1,0\mu\text{g}$), $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($1,5\mu\text{g}$) und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ ($1,0\mu\text{g}$) zum Einsatz. Für eine kombinierte Verabreichung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($0,5\mu\text{g} + 1,5\mu\text{g}$ und $1,0\mu\text{g} + 1,5\mu\text{g}$) in einem Verhältnis von 1:3 und 2:3 und die Gruppe $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($1,0\mu\text{g} + 1,5\mu\text{g}$) im Verhältnis 2:3 zur Verfügung.

Versuchsanordnung	: kurativer Kükentest
Verabreichungsform	: oral
Vorperiode (Depletion)	: 7 Tage
Hauptperiode (kurative Phase)	: 7 Tage
Tierzahl pro Gruppe	: 11
Parameter	: Gewichtsentwicklung, Futterverzehr, Futterverwertung, Serumcalcium, absoluter und relativer Knochenaschegehalt und CaBP

Ergebnisse:

Gewichtsentwicklung (Tab. 17)

Im Vergleich zur Streuung innerhalb der Gruppen konnten nur relativ geringe Unterschiede zwischen den Gruppen gemessen werden. Der größte Zuwachs gegenüber der negativen Kontrolle

wurde noch bei der Kombinationsgruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ (1,0 μg + 1,5 μg) gemessen.

Futtermverzebr und Futtermverwertung (Tab. 18)

Während sich die Gruppen mit den einzeln verabreichten Metaboliten und der niedrig dosierten Kombination von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ (0,5 μg + 1,5 μg) nur unwesentlich unterschieden, konnte bei der negativen Kontrolle und den kombinierten Gruppen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ (1,0 μg + 1,5 μg), sowie mit $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ (1,0 μg + 1,5 μg) ein deutlich niedrigerer Verbrauch an Futter festgestellt werden. Die beiden letztgenannten Kombinationen wiesen sich auch durch die beste Futtermverwertung aus.

Serumcalcium (Tab. 19)

$1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ (1,5 μg) vermochte keinen Anstieg der Calciumkonzentrationen im Serum zu bewirken. Hingegen konnte eine dosisabhängige Erhöhung des Serumcalciums durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0,5 μg und 1,0 μg) gesehen werden. Eine kombinierte Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ (0,5 μg + 1,5 μg und 1,0 μg + 1,5 μg) erbrachte keine weitere Steigerung gegenüber einer alleinigen Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Während der Wert für $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ (1,0 μg) zwischen den Calciumkonzentrationen der beiden Gruppen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0,5 μg und 1,0 μg) zu liegen kam, konnte in der Kombination von $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ der höchste Calciumwert im Serum gemessen werden.

Absoluter und relativer Knochenaschegehalt (Tab. 20)

Alle einzeln verabreichten Metabolite erzielten sowohl absolut, als auch relativ einen höheren Aschegehalt als die D-freie Kontrollgruppe. In allen Kombinationsgruppen konnte ein Anstieg des Knochenaschegehaltes der Tibia gegenüber den entsprechenden Gruppen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, sowie $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ gesehen werden. Während der höchste Betrag nach einer Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ (1,0 μg + 1,5 μg) gesehen

werden konnte, war der Wirkungsanstieg in der Kombination am deutlichsten bei der Gruppe mit $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$. Die Gruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($1,0\mu\text{g} + 1,5\mu\text{g}$) lag etwa 20% über einer rein additiven Wirkung der Komponenten, die Gruppe $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($1,0\mu\text{g} + 1,5\mu\text{g}$) sogar mehr als 80%. Relativ zum Trockengewicht der Tibia stieg der Knochenaschegehalt bei den Gruppen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($1,0\mu\text{g} + 1,5\mu\text{g}$), sowie $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($1,0\mu\text{g} + 1,5\mu\text{g}$) am deutlichsten gegenüber der negativen Kontrolle an. Während noch beide Gruppen einen Anstieg im Vergleich zur Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ zur Folge hatten, lag nur die Wirkung der Gruppe $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ noch deutlich über einer additiven Wirkung.

CaBP (Tab. 21)

Ein deutlicher Anstieg der CaBP-Aktivität gegenüber der negativen Kontrolle konnte nur in den Gruppen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($1,0\mu\text{g} + 1,5\mu\text{g}$), $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($1,0\mu\text{g} + 1,5\mu\text{g}$), sowie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($1,0\mu\text{g}$) gesehen werden. Die Gruppen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($0,5\mu\text{g}$), $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ ($1,0\mu\text{g}$), $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($1,5\mu\text{g}$), sowie die Kombinationsgruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($0,5\mu\text{g} + 1,5\mu\text{g}$) unterschieden sich hingegen nicht signifikant von der negativen Kontrollgruppe ($p=0,001$). Die Gruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($1,0\mu\text{g} + 1,5\mu\text{g}$) erbrachte gegenüber der Gruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ einen Wirkungsanstieg um nahezu 40% ($p=0,05$). In der Gruppe $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($1,0\mu\text{g} + 1,5\mu\text{g}$) wurde ein ähnlicher Wert für die CaBP-Aktivität gemessen, wie für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($1,0\mu\text{g} + 1,5\mu\text{g}$). Dies ist um so höher zu bewerten, da die Einzelkomponenten jeweils noch keine Wirkung auf das CaBP zu erzielen vermochten.

Während noch im Versuch II durch eine kombinierte Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($1,5\mu\text{g} + 1,5\mu\text{g}$) ein Wirkungsanstieg um 125% auf das CaBP gesehen werden konnte, sank der

stimulierende Effekt im Versuch III auf 40%, nachdem man bei gleichbleibender Konzentration von $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($1,5\mu\text{g}$) die Dosierung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf $1,0\mu\text{g}$ herabgesetzt hatte. Bei einer Dosierung von $0,5\mu\text{g}$ konnte weder bei einer alleinigen, noch in Kombination mit $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ein Anstieg gegenüber der negativen Kontrolle gesehen werden. Obwohl $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ eine geringere Wirkung auf die CaBP-Aktivität zu besitzen schien, als die äquimolare Menge an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, konnten in Kombination mit $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ etwa gleich hohe Aktivitäten für das CaBP gemessen werden.

Bei allen anderen Parametern zeigten sich nur bei den Werten für den absoluten und relativen Knochenaschegehalt deutlichere Unterschiede zwischen den Gruppen. Der synergistische Effekt in der Kombination $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($1,0\mu\text{g} + 1,5\mu\text{g}$) erwies sich auch hier stärker ausgeprägt, als in der äquimolar dosierten Gruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($1,0\mu\text{g} + 1,5\mu\text{g}$).

Mit Strontiumhemmung der 1α -Hydroxylase:

Nachdem kein Effekt von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Modell der strontiuminduzierten Rachitis gefunden werden konnte, sollte überprüft werden, ob unter diesen Bedingungen $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ einen stimulierenden Einfluß auf das CaBP ausüben kann. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurden im Verhältnis 1:1 eingesetzt.

Es wurde eine D-freie Kontrolle, eine Gruppe mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($3,0\mu\text{g}$), eine weitere mit $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($3,0\mu\text{g}$) und eine kombinierte Gruppe mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($3,0\mu\text{g} + 3,0\mu\text{g}$) in den Versuch genommen. Die Versuchsanordnung entsprach derjenigen im ersten Abschnitt.

Ergebnisse:

CaBP (Tab. 21)

Die Aktivität konnte durch $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($3,0\mu\text{g}$) nicht gegenüber der negativen Kontrolle gesteigert werden ($p=0,01$). Nur die Gruppen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($3,0\mu\text{g}$), sowie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($3,0\mu\text{g} + 3,0\mu\text{g}$) erzielten einen Aktivitätsanstieg. Durch die kombinierte Verabreichung konnte die Wirkung auf das CaBP signifikant ($p=0,01$) um mehr als 75% gesteigert werden.

Während im Versuch II kein stimulierender Effekt von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Modell der strontiuminduzierten Rachitis registriert wurde, konnte für die Kombination $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine überadditive Wirkung gefunden werden.

Tabelle 17

Kurativer Kükentest

Versuch III: Gewichtsentwicklung

(n = 11)

Gruppe	Diätzusatz pro kg Futter	tägliche Zunahme pro Tier	
		$\bar{x}$	$\pm s$
ohne Strontium			
1	D-freie Kontrolle	78,1	8,8
2	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	82,8	12,0
3	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	82,6	11,3
4	1,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	84,2	11,4
5	1,0µg 1 (OH)D ₃	87,3	10,5
6	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 1,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	84,3	7,6
7	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 1,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	92,0	9,0
8	1,0µg 1 (OH)D ₃ + 1,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	86,8	5,4
mit Strontium			
9	D-freie Kontrolle	51,2	10,6
10	3,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	43,6	12,6
11	3,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	54,0	9,3
12	3,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 3,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	35,2	12,6

Tabelle 18

Kurativer Kükentest

Versuch III: Futterverbrauch (A) und Futterverwertung (B)

(n = 11)

Gruppe	Diätzusatz pro kg Futter	A in $\frac{g}{\bar{x}}$ pro Tier und Tag	B $\bar{x}$
ohne Strontium			
1	D-freie Kontrolle	27,6	2,47
2	0,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$	32,2	2,72
3	1,0 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$	31,4	2,66
4	1,5 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	32,0	2,66
5	1,0 μ g 1 (OH)D $_3$	30,0	2,41
6	0,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + 1,5 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	30,9	2,57
7	1,0 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + 1,5 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	27,8	2,12
8	1,0 μ g 1 (OH)D $_3$ + 1,5 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	28,5	2,30
mit Strontium			
9	D-freie Kontrolle	26,6	3,64
10	3,0 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$	27,1	4,35
11	3,0 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	21,5	2,79
12	3,0 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + 3,0 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	20,0	3,98

Tabelle 19

Kurativer Kükentest

Versuch III: Serumcalcium

(n = 11)

Gruppe	Diätzusatz pro kg Futter	mg / $\bar{x}$	100ml Serum $\pm s$
ohne Strontium			
1	D-freie Kontrolle	8,0	0,9
2	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	8,9	1,0
3	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	9,5	1,5
4	1,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	8,2	0,8
5	1,0µg 1 (OH)D ₃	9,2	1,1
6	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 1,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	9,1	0,9
7	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 1,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	9,6	0,9
8	1,0µg 1 (OH)D ₃ + 1,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	9,9	0,9
mit Strontium			
9	D-freie Kontrolle	9,6	0,8
10	3,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	9,2	0,6
11	3,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	9,5	0,6
12	3,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 3,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	8,3	0,3

Tabelle 20

Kurativer Kükentest

Versuch III: Absoluter und relativer Knochenaschegehalt

(n = 11)

Gruppe	Diätzusatz pro kg Futter	Knochenaschegehalt	
		in g $\bar{x}$	in % $\bar{x}$
ohne Strontium			
1	D-freie Kontrolle	0,153	27,9
2	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,162	29,7
3	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,176	30,2
4	1,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	0,167	28,8
5	1,0µg 1 (OH)D ₃	0,158	29,2
6	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 1,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	0,171	27,4
7	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 1,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	0,198	30,7
8	1,0µg 1 (OH)D ₃ + 1,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	0,188	31,0
mit Strontium			
9	D-freie Kontrolle	0,092	20,1
10	3,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,095	21,2
11	3,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	0,094	19,6
12	3,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 3,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	0,095	22,3

Tabelle 21

Kurativer Kükentest

Versuch III: CaBP

(n = 11)

Gruppe	Diätzusatz pro kg Futter	$\bar{x}$	$\pm s$
ohne Strontium			
1	D-freie Kontrolle	1,4	0,3
2	0,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$	1,8	0,3
3	1,0 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$	2,7	0,6
4	1,5 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	1,7	0,3
5	1,0 μ g 1 (OH)D $_3$	1,5	0,4
6	0,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + 1,5 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	1,5	0,3
7	1,0 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + 1,5 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	3,2	0,6
8	1,0 μ g 1 (OH)D $_3$ + 1,5 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	3,0	0,7
mit Strontium			
9	D-freie Kontrolle	1,5	0,3
10	3,0 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$	3,3	1,0
11	3,0 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	1,6	0,4
12	3,0 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + 3,0 μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$	4,7	0,9

4.2 Prophylaktischer Kükentest

Im vierten Versuch sollte herausgefunden werden, ob die bei Vitamin D-depletierten Küken gefundene Überadditive Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ auf das CaBP im Darm auch nach einer prophylaktischen Gabe an gesunde, frischgeschlüpfte Küken nachzuweisen ist. Weiterhin sollte überprüft werden, ob nach einer dreiwöchigen Gabe der Metaboliten in der Kombination eventuell eine stärker stimulierende Wirkung auf die Parameter Gewichtsentwicklung, Serumcalcium und Knochenasche gefunden werden kann.

Versuch IV:

Versuch IV stellt einen Vorversuch dar. Es sollte überprüft werden, ob auch nach einer prophylaktischen Verabreichung der Kombinationsgruppen ein synergistischer Effekt auf die CaBP-Synthese des Kükendarmes gefunden werden kann. Da die Suche nach einer geeigneten Dosierung in diesem Versuchsmodell im Vordergrund stand, wurde deshalb als einziger Parameter die CaBP-Aktivität gemessen.

Es wurde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und Vitamin D_3 erprobt. Insgesamt kamen 17 Gruppen zum Einsatz: Neben einer positiven ($8\mu\text{g}$ Vitamin D_3) und einer negativen Kontrolle wurden je drei Gruppen ($0,25\mu\text{g}$, $0,5\mu\text{g}$, $1,0\mu\text{g}$) mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ gebildet. Bei einer äquimolaren Dosierung in den Kombinationsgruppen ergab sich für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$, sowie $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ jeweils drei mögliche Verknüpfungen ($0,25\mu\text{g} + 0,25\mu\text{g}$, $0,25\mu\text{g} + 0,5\mu\text{g}$ und $1,0\mu\text{g} + 1,0\mu\text{g}$).

Versuchsanordnung	: prophylaktischer Kükentest
Verabreichungsform	: oral
Versuchsperiode	: 21 Tage
Tierzahl pro Gruppe	: 10
Parameter	: CaBP

Ergebnisse:

CaBP (Tab. 22)

Die höchste Aktivität konnte bei der Kombination $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($1,0\mu\text{g} + 1,0\mu\text{g}$) registriert werden, gefolgt von der Gruppe $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($1,0\mu\text{g} + 1,0\mu\text{g}$), der positiven Kontrolle und der Gruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($1,0\mu\text{g}$). Auch die Gruppen mit $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ ($1,0\mu\text{g}$), sowie mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($0,5\mu\text{g} + 0,5\mu\text{g}$) konnten eine gesteigerte Aktivität gegenüber der negativen Kontrolle bewirken. Die Gruppen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($0,25\mu\text{g}$ und $0,5\mu\text{g}$), $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ ($0,25\mu\text{g}$ und $0,5\mu\text{g}$), $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($0,25\mu\text{g}$, $0,5\mu\text{g}$ und $1,0\mu\text{g}$), die niedrig dosierten Kombinationsgruppen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($0,25\mu\text{g} + 0,25\mu\text{g}$), sowie $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($0,25\mu\text{g} + 0,25\mu\text{g}$ und $0,5\mu\text{g} + 0,5\mu\text{g}$) zeigten keinen signifikanten Unterschied zur negativen Kontrolle ($p=0,001$). Obwohl $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in einer Dosierung von $0,5\mu\text{g}$ jeweils alleine verabreicht noch keinen Anstieg der CaBP-Aktivität nach sich zogen, wurde in der Kombination $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($0,5\mu\text{g} + 0,5\mu\text{g}$) ein Anstieg gegenüber der negativen Kontrolle gemessen ($p=0,01$). Noch deutlicher konnte der Wirkungsanstieg in der höchsten Dosierung gesehen werden. Die Aktivitätssteigerung durch die Gruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($1,0\mu\text{g} + 1,0\mu\text{g}$) gegenüber der Gruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ betrug mehr als 100%. Obertroffen wurde dieser Wirkungsanstieg noch durch die Gruppe $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($1,0\mu\text{g} + 1,0\mu\text{g}$). Bei dieser Gruppe konnte eine Aktivitätssteigerung um 220% gegenüber der Gruppe $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ ($1,0\mu\text{g}$) verzeichnet werden.

Auch im prophylaktischen Kükentest konnte durch eine kombinierte Verabreichung ein synergistischer Effekt auf das CaBP im Kükendarm ausgelöst werden. Während bei einer äquimolaren Dosierung der Komponenten von $0,25\mu\text{g}$ weder in der Kombinationsgruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, noch in der Gruppe $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine Wirkung erzielt werden konnte, stellte sich bei einer Gabe von $0,5\mu\text{g}$ bereits

ein synergistischer Effekt bei der Kombination $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ein, obwohl die Einzelverabreichung der Metaboliten noch keine signifikante Aktivitätssteigerung gegenüber der negativen Kontrolle zu bewirken vermochte. Ein Vergleich von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ in einer Dosierung von $1,0\mu\text{g}$ zeigte, daß $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ zwar in der äquimolaren Dosierung nur etwa knapp 40% der Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf das CaBP besaß, in der Kombination mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ jedoch eine weitaus deutlichere Aktivitätssteigerung (220%) ermöglichte, als dies bei $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (100%) der Fall war.

Tabelle 22

Prophylaktischer Kükentest

Versuch IV: CaBP

(n = 10)

Gruppe	Diätzusatz pro kg Futter	$\bar{x}$	$\pm s$
1	D-freie Kontrolle	0,98	0,36
2	8,0µg Vitamin D ₃	2,05	0,66
3	0,25µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,85	0,14
4	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	1,09	0,17
5	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	2,02	0,54
6	0,25µg 1 (OH)D ₃	0,87	0,27
7	0,5µg 1 (OH)D ₃	0,96	0,33
8	1,0µg 1 (OH)D ₃	1,37	0,53
9	0,25µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	0,97	0,16
10	0,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	0,91	0,20
11	1,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	1,04	0,37
12	0,25µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,25µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	1,24	0,57
13	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	1,49	0,33
14	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 1,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	3,11	1,26
15	0,25µg 1 (OH)D ₃ + 0,25µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	1,20	0,41
16	0,5µg 1 (OH)D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	1,53	0,74
17	1,0µg 1 (OH)D ₃ + 1,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	2,23	0,37

Versuch V:

Nachdem ein synergistischer Effekt auch durch eine prophylaktische Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ auf das CaBP ausgelöst werden könnte, sollte in einem weiteren Versuch die Auswirkung der kombinierten, dreiwöchigen Applikation auf die Parameter Gewichtsentwicklung, Futterverwertung, Futterverzehr, Serumcalcium, absoluter und relativer Knochenaschegehalt untersucht werden.

Zusammen mit einer negativen und einer positiven Kontrolle ($8\mu\text{g}$ Vitamin D_3) wurden vier unterschiedliche Konzentrationen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($0,5\mu\text{g}$, $1,0\mu\text{g}$, $2,0\mu\text{g}$ und $4,0\mu\text{g}$) und zwei von $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($2,0\mu\text{g}$ und $4,0\mu\text{g}$) eingesetzt. In vier Kombinationen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ wurden die Dosierungen $0,5\mu\text{g} + 2,0\mu\text{g}$, $1,0\mu\text{g} + 2,0\mu\text{g}$, $2,0\mu\text{g} + 2,0\mu\text{g}$ und $1,0\mu\text{g} + 4,0\mu\text{g}$ gewählt.

Versuchsanordnung	: prophylaktischer Kükentest
Verabreichungsform	: oral
Versuchsperiode	: 21 Tage
Tierzahl pro Gruppe	: 11
Parameter	: Gewichtsentwicklung, Futterverzehr, Futterverwertung, Serumcalcium, absoluter und relativer Knochenaschegehalt

Ergebnisse:

Gewichtsentwicklung (Tab. 23)

Alle Gruppen zeichneten sich durch eine bessere Gewichtsentwicklung als die negative Kontrolle aus. Die beste Zunahme war bei der Gruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($2,0\mu\text{g}$) zu sehen, gefolgt von drei Kombinationsgruppen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($2,0\mu\text{g} + 2,0\mu\text{g}$, $1,0\mu\text{g} + 2,0\mu\text{g}$ und $1,0\mu\text{g} + 4,0\mu\text{g}$) und der positiven Kontrolle. Bei einer alleinigen Applikation von

1,25(OH)₂D₃ konnte bis zu einer Dosis von 2,0µg ein steter Anstieg der Gewichtszunahme gesehen werden, nach einer weiteren Verdopplung auf 4,0µg wurde hingegen ein deutlich depressiver Einfluß auf die Gewichtsentwicklung sichtbar. Eine kontinuierliche Steigerung der Zunahmen konnte auch bei den drei Kombinationen von 1,25(OH)₂D₃ mit 1,24,25(OH)₃D₃ (je 2,0 µg) beobachtet werden. Während jedoch durch eine Dosierung von 0,5µg + 2,0µg eine Wirkung erzielt werden konnte, die fast 30% über einer additiven Wirkung lag, entsprach die Zunahme der Kombination mit 1,0µg + 2,0µg nur einer additiven Wirkungssteigerung. Die Zunahme der Kombinationsgruppe mit der Dosierung 2,0µg + 2,0µg war sogar noch deutlich geringer, als diejenige von der Gruppe 2,0µg 1,25(OH)₂D₃. Eine Verdopplung der Konzentration von 1,24,25(OH)₃D₃ in der Kombination (1,0µg + 2,0µg verglichen mit 1,0µg + 4,0µg) erbrachte keine Änderung der Gewichtszunahme und konnte somit nur einen unteradditiven Effekt ausüben.

Futtermverzehr und Futtermverwertung (Tab.24)

Gegenüber der negativen Kontrolle konnte in allen Gruppen ein stärkerer Futtermverbrauch festgestellt werden. In den Gruppen mit 1,25(OH)₂D₃ konnte bis zu einer Konzentration von 2,0µg auch ein ansteigender Futtermverzehr bemerkt werden, bei der Gruppe mit 4,0µg stellte sich ein verminderter Futtermverbrauch ein. In allen Kombinationsgruppen wurde deutlich mehr Futter verzehrt, als in den entsprechenden Gruppen mit 1,25(OH)₂D₃ alleine. Die beste Futtermverwertung war bei der positiven, die schlechteste bei der negativen Kontrolle und bei der Gruppe 1,25(OH)₂D₃ und 1,24,25(OH)₃D₃ (2,0µg + 2,0µg) zu finden. Während bei den Gruppen mit 1,25(OH)₂D₃ (0,5µg und 1,0µg) und mit 1,24,25(OH)₃D₃ (2,0µg und 4,0µg) noch eine schlechte Futtermverwertung festgestellt werden konnte, lag im Vergleich der Kombinationen die beste Futtermverwertung bei den niedriger dosierten Gruppen vor (0,5µg + 2,0µg und 1,0µg + 2,0µg).

Serumcalcium (Tab. 25)

Außer bei den Gruppen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0,5 μg), sowie $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ (2,0 μg und 4,0 μg) konnte bei den übrigen Gruppen ein deutlicher Anstieg der Calciumwerte im Serum verglichen mit der negativen Kontrolle erkannt werden. Bei allen Gruppen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ war ein stetiger, konzentrationsabhängiger Anstieg der Calciumwerte zu erkennen. Auch in allen Kombinationsgruppen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und 2,0 μg $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ konnte ein von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -dosisabhängiger Anstieg des Calciums registriert werden. Während jedoch in der Kombinationsgruppe mit 0,5 μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ein deutlicher Anstieg des Serumcalciumwertes vorlag, obwohl jeweils einzeln verabreicht keine Wirkung erzielt werden konnte, und auch noch eine Wirkungssteigerung um mehr als 70% von der Gruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (1,0 μg) zur Gruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ (1,0 μg + 2,0 μg) gesehen werden konnte, war kein stimulierender Effekt mehr auf die Serumcalciumwerte der Gruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ (2,0 μg + 2,0 μg) gegenüber $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (2,0 μg) vorhanden. Eine Verdopplung der Konzentration von $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ in der Kombination (1,0 μg + 2,0 μg verglichen mit 1,0 μg + 4,0 μg) verursachte keine nennenswerte Änderung der Calciumwerte.

Absoluter und relativer Knochenaschegehalt (Tab. 26)

Verglichen mit der negativen Kontrolle war in jeder eingesetzten Gruppe ein Anstieg der Knochenasche sowohl absolut, als auch relativ zur Trockenmasse erkennbar. Bei beiden Parametern konnten für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (2,0 μg) die höchsten Knochenaschewerte gefunden werden. Die Gruppen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (4,0 μg), sowie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ (1,0 μg + 2,0 μg ; 2,0 μg + 2,0 μg ; 1,0 μg + 4,0 μg) zeigten mindestens soviel Wirkung, wie die positive Kontrolle. In Relation zur Trockenmasse zeichnete sich in der Gruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ (0,5 μg + 2,0 μg) nur ein unteradditiver Effekt ab. In beiden Kombinationen mit jeweils $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (1,0 μg) konnte dagegen eine deutliche, synergistische Wirkung gesehen werden. Das mittlere Knochenaschegewicht der Tibia

wurde in den Kombinationsgruppen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($0,5\mu\text{g} + 2,0\mu\text{g}$; $1,0\mu\text{g} + 2,0\mu\text{g}$ und $1,0\mu\text{g} + 4,0\mu\text{g}$) synergistisch beeinflusst. Die Wirkungsverbesserung lag zwischen 30% und 40% gegenüber einem errechneten, additivem Effekt. Die Gruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($2,0\mu\text{g} + 2,0\mu\text{g}$) hatte, verglichen mit den anderen Kombinationen, den relativ und absolut höchsten Knochenaschegehalt zu verzeichnen. Die Werte lagen jedoch immer niedriger, als diejenigen der Gruppe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($2,0\mu\text{g}$). Eine Erhöhung der $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ -Komponente in der Kombination vermag das Knochenaschegewicht zu steigern. Vergleicht man den Knochenaschegehalt absolut und relativ von den Gruppen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ in der Konzentration $1,0\mu\text{g} + 2,0\mu\text{g}$ mit derjenigen von $1,0\mu\text{g} + 4,0\mu\text{g}$, so ergab sich ein Anstieg der Wirkung um 13%.

Nach einer dreiwöchigen, prophylaktischen Gabe der Metabolite konnte nicht nur bezüglich des Parameters CaBP (Versuch IV) ein synergistischer Effekt gesehen werden, vielmehr zeigte sich auch bei der Gewichtszunahme, dem Serumcalcium und der Knochenasche eine überadditive Wirkungsverstärkung nach einer Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$.

Mit Ausnahme der Serumcalciumwerte konnten bei einer hohen Dosierung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($2,0\mu\text{g}$) in der Kombination die Werte, die durch die alleinige Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gemessen wurden, nicht mehr erreicht werden. Während eine Verdopplung der Komponente $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ in der Kombination von $2,0\mu\text{g}$ auf $4,0\mu\text{g}$ keinen Einfluß auf die Gewichtszunahme, den Futterverbrauch und dem Calciumspiegel im Serum auszuüben schien, konnte beim Parameter Knochenasche absolut und relativ ein Anstieg um 13% festgestellt werden.

Tabelle 23

Prophylaktischer Kükentest

Versuch V: Gewichtsentwicklung

(n = 11)

Gruppe	Diätzusatz pro kg Futter	tägliche Zunahme pro Tier	
		$\bar{x}$	$\pm s$
		in g	
1	D-freie Kontrolle	196,3	35,5
2	8,0 μ g Vitamin D ₃	420,0	58,7
3	0,5 μ g 1,25(OH) ₂ D ₃	255,5	48,7
4	1,0 μ g 1,25(OH) ₂ D ₃	366,1	49,8
5	2,0 μ g 1,25(OH) ₂ D ₃	497,8	83,5
6	4,0 μ g 1,25(OH) ₂ D ₃	405,6	98,2
7	2,0 μ g 1,24,25(OH) ₃ D ₃	255,8	60,0
8	4,0 μ g 1,24,25(OH) ₃ D ₃	294,3	60,7
9	0,5 μ g 1,25(OH) ₂ D ₃ + 2,0 μ g 1,24,25(OH) ₃ D ₃	350,4	53,2
10	1,0 μ g 1,25(OH) ₂ D ₃ + 2,0 μ g 1,24,25(OH) ₃ D ₃	427,6	52,1
11	2,0 μ g 1,25(OH) ₂ D ₃ + 2,0 μ g 1,24,25(OH) ₃ D ₃	456,6	46,5
12	1,0 μ g 1,25(OH) ₂ D ₃ + 4,0 μ g 1,24,25(OH) ₃ D ₃	420,3	65,3

Tabelle 24

Prophylaktischer Kükentest

Versuch V: Futterverbrauch (A) und Futterverwertung (B)

(n = 11)

Gruppe	Diätzusatz pro kg Futter	A in $\frac{g}{\bar{x}}$ pro Tier und Tag	B $\frac{\bar{x}}{\bar{x}}$
1	D-freie Kontrolle	17,7	2,01
2	8,0µg Vitamin D ₃	28,3	1,50
3	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	20,7	1,81
4	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	29,9	1,82
5	2,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	36,3	1,56
6	4,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	28,7	1,57
7	2,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	20,7	1,81
8	4,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	22,9	1,74
9	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 2,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	25,5	1,62
10	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 2,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	31,7	1,65
11	2,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 2,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	40,2	1,95
12	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 4,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	32,6	1,72

Tabelle 25

Prophylaktischer Kükentest

Versuch V: Serumcalcium

(n = 11)

Gruppe	Diätzusatz pro kg Futter	mg / $\bar{x}$ 100ml Serum	$\pm s$
1	D-freie Kontrolle	7,1	0,7
2	8,0 μ g Vitamin D ₃	11,9	1,2
3	0,5 μ g 1,25(OH) ₂ D ₃	7,1	0,8
4	1,0 μ g 1,25(OH) ₂ D ₃	8,9	0,8
5	2,0 μ g 1,25(OH) ₂ D ₃	12,5	0,3
6	4,0 μ g 1,25(OH) ₂ D ₃	13,0	0,5
7	2,0 μ g 1,24,25(OH) ₃ D ₃	7,5	0,7
8	4,0 μ g 1,24,25(OH) ₃ D ₃	7,0	0,8
9	0,5 μ g 1,25(OH) ₂ D ₃ + 2,0 μ g 1,24,25(OH) ₃ D ₃	3,7	1,3
10	1,0 μ g 1,25(OH) ₂ D ₃ + 2,0 μ g 1,24,25(OH) ₃ D ₃	10,2	1,7
11	2,0 μ g 1,25(OH) ₂ D ₃ + 2,0 μ g 1,24,25(OH) ₃ D ₃	12,9	1,2
12	1,0 μ g 1,25(OH) ₂ D ₃ + 4,0 μ g 1,24,25(OH) ₃ D ₃	10,5	1,4

Tabelle 26

Prophylaktischer Kükentest

Versuch V: Absoluter und relativer Knochenaschegehalt

(n = 11)

Gruppe	Diätzusatz pro kg Futter	Knochenaschegehalt	
		in g $\bar{x}$	in % $\bar{x}$
1	D-freie Kontrolle	0,231	25,2
2	8,0µg Vitamin D ₃	0,628	36,2
3	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,303	28,1
4	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,454	30,1
5	2,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,872	41,6
6	4,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,752	41,0
7	2,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	0,298	28,1
8	4,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	0,352	29,4
9	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 2,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	0,425	30,3
10	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 2,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	0,624	35,7
11	2,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 2,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	0,772	38,6
12	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 4,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	0,676	37,1

5 DISKUSSION

Obwohl $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ in allen Zielorganen für Vitamin D eine Wirkung erzielen können, für $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eigene Rezeptoren gefunden werden konnten und eine eigenständige Wirkung an einigen Organen diskutiert wird, gilt die biologische Funktion beider Metabolite weiterhin als nicht geklärt. Trotz der noch umstrittenen Frage nach einer physiologischen Wirkung wird nach einer kombinierten Gabe mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ von Ergebnissen berichtet, die sich sowohl qualitativ, als auch quantitativ von der Wirkung der einzeln verabreichten Metabolite unterscheiden. Meine Untersuchungen erbrachten zu diesen noch offenen Fragen folgende Diskussionsbeiträge:

Nach einer oralen Gabe trat sowohl bei der Kombination $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, als auch bei der von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ am rachitischen Hühnerküken ein deutlicher, synergistischer Effekt bezüglich der CaBP-Aktivität auf (Abb.1). Während für die Kombination von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ein überadditiver Anstieg der Wirkung bei einem Verhältnis von 1:10 festgestellt wurde ($1,5\mu\text{g} + 15,0\mu\text{g}$), wurde in der Kombination mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ein Synergismus schon bei einem Verhältnis von 1:1 und 1:2 ausgelöst ($1,5\mu\text{g} + 1,5\mu\text{g}$ und $1,5\mu\text{g} + 3,0\mu\text{g}$). $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und auch $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ konnten in diesem Konzentrationsbereich alleine jeweils noch keinen Effekt gegenüber der negativen Kontrolle hervorrufen. Der synergistische Effekt verringerte sich, sobald die Dosis für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ soweit herabgesetzt wurde, daß es selbst keine oder nur noch eine geringe Wirkung besaß. Während noch in der Kombination $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($1,5\mu\text{g} + 1,5\mu\text{g}$) die Wirkung um 125% über einer additiven Wirkung zu liegen kam, sank dieser synergistische Effekt nach einer Reduktion der Dosis für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf $1,0\mu\text{g}$ auf nur noch 40% über der Summe der Einzelwirkungen ab. Nachdem die Dosis für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf $0,5\mu\text{g}$ herabgesetzt wurde ($0,5\mu\text{g} +$

1,5 μ g), konnte die Kombination, ebenso wie die einzeln verabreichten Metaboliten selbst, keinen Einfluß mehr auf die CaBP-Synthese ausüben.

Auch $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$, das synthetische Analogon von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, vermag zusammen mit $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Modell des rachitischen Hühnerkükens einen überadditiven Wirkungsanstieg auf das CaBP auszuüben. Da es in der eingesetzten Dosis von 1,0 μ g selbst noch keine Wirkung zeigte, in der Kombination mit $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aber eine Wirkung erzeugen konnte, die derjenigen der äquimolar dosierten Kombination mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ entsprach, wurde durch den Austausch von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ die überadditive Wirkungsverstärkung in der Kombination noch vergrößert.

Bei den anderen gemessenen Parametern deuteten sich gleichfalls stimulierende Effekte nach einer kombinierten Gabe an. Am empfindlichsten schien der Knochenaschegehalt auf eine unterschiedliche Konzentration und Kombination der Metabolite zu reagieren. Hier deuteten sich ebenfalls additive, teilweise sogar überadditive Effekte an. Da es sich aber bei der Einlagerung von anorganischer Substanz in den Knochen, ebenso wie bei der Gewichtszunahme, dem Futterverzehr und der Futterverwertung, um Parameter handelt, die gerade an vorher Vitamin D-depletierten Tieren mit deutlichen rachitischen Symptomen anfangs nur geringe Änderungen zeigen und die sich erst nach einer längeren Rekonvaleszenz wieder normalisieren, muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß nach einer längeren, kurativen Phase oder in einem prophylaktischen Test auch diese Parameter deutlichere Unterschiede hätten erkennen lassen können. Die Regulation des Serumcalciumspiegels reagiert zwar weitaus empfindlicher auf eine veränderte Stoffwechsellage, jedoch greifen hier verschiedene, teilweise entgegengesetzte Mechanismen gleichzeitig an. Die Konzentration des Calciums im Serum wird von der Absorption im Darm, der Retention in der Niere, der Resorption aus dem Knochen, sowie der Einlagerung in den Knochen beeinflusst. Es muß deshalb damit gerechnet werden,

daß die beginnende Retention von Calcium in den Knochen die anderen calcämischen Effekte überlagern kann.

Im Modell der strontiuminduzierten Rachitis konnte gezeigt werden, daß offensichtlich nicht $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, sondern $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ in Kombination mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ für den synergistischen Effekt auf das CaBP im Darm des Hühnerkükens verantwortlich zu machen ist (Abb. 2). Nach einer kombinierten Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($3,0\mu\text{g} + 15,0\mu\text{g}$) wurde kein signifikanter Unterschied der CaBP-Aktivität gegenüber einer alleinigen Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($3,0\mu\text{g}$) gefunden. $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ beeinflusste in der Kombination hingegen die CaBP-Aktivität synergistisch. $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ muß also erst noch einer weiteren Hydroxylierung am Kohlenstoffatom C(1) unterzogen werden, bevor es in der Kombination mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ einen überadditiven Effekt auf das CaBP auszuüben vermag. Die Dosierung für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mußte bei einer gleichzeitigen Gabe von Strontium von $1,5\mu\text{g}$ auf $3,0\mu\text{g}$ heraufgesetzt werden, um eine deutliche Wirkung auf das CaBP zu erzielen. Der Grund ist darin zu suchen, daß Strontium bei einer gleichzeitigen Verfütterung einer calciumarmen Diät nicht nur die 1α -Hydroxylierung in der Niere hemmt, sondern in vielfältigerweise den Stoffwechsel beeinflusst, etwa den Aschegehalt des Skelettes, den Fett- und Wasserhaushalt und das Wachstum (SCHMID, 1961). Bei den Parametern Wachstum, Futterverzehr und Futterverwertung, Serumcalcium, sowie Knochenaschegehalt wurde die Wirkung durch die unterschiedlichen Metabolite so stark von den Symptomen der strontiuminduzierten Rachitis überlagert, daß eine Interpretation der Ergebnisse nicht möglich erschien.

Nicht nur beim Vitamin D-depletierten Tier, sondern auch nach einer prophylaktischen, oralen Gabe konnte ein deutlich überadditiver Effekt auf die Synthese von CaBP registriert werden. In der Kombination $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ lagen die Werte für die CaBP-Aktivität ab einer Dosierung von $0,5\mu\text{g} + 0,5\mu\text{g}$, in der von $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ab $1,0\mu\text{g} + 1,0\mu\text{g}$, über denen der negativen Kontrolle,

obwohl nach alleiniger Verabreichung der Metabolite in keinem Fall eine Wirkung zu verzeichnen war. Ähnlich wie nach einer kurativen Gabe vermochte $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ auch im prophylaktischen Test nicht die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nach einer äquimolaren Dosierung zu erreichen (40%). Im Vergleich der kombinierten Gabe von $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (jeweils $1,0\mu\text{g} + 1,0\mu\text{g}$) wies sich die Kombination mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zwar durch eine stärkere Wirkung aus, der überadditive Effekt zeigte sich aber in der Kombination mit $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ deutlicher ausgeprägt (220% Wirkungsanstieg, gegenüber 100% in der Kombination mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$).

Auch für die Parameter Serumcalcium, sowie relativer und absoluter Knochenaschegehalt konnte eine überadditive Wirkung nach einer dreiwöchigen, prophylaktischen Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gesehen werden. Für alle drei Parameter war der überadditive Effekt in einer Konzentration von $0,5\mu\text{g} + 2,0\mu\text{g}$, sowie $1,0\mu\text{g} + 2,0\mu\text{g}$ stark ausgeprägt. Während aber bei einer hohen Dosierung von $2,0\mu\text{g} + 2,0\mu\text{g}$ die Wirkung auf die Knochenasche durch die Kombination schon wieder geringer war, als durch $2,0\mu\text{g}$ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ alleine, konnte keine depressive Wirkung auf die Calciumkonzentration im Serum festgestellt werden. Für die Gewichtsentwicklung zeigte sich ebenfalls eine synergistische Wirkung bei einer gleichzeitig guten Futterverwertung in den Konzentrationen $0,5\mu\text{g} + 2,0\mu\text{g}$, sowie $1,0\mu\text{g} + 2,0\mu\text{g}$. Nach einer Gabe von $2,0\mu\text{g} + 2,0\mu\text{g}$ ist ein depressiver Einfluß auf die Gewichtsentwicklung bei gleichzeitig schlechterer Futterverwertung zu erkennen. Eine Verdopplung der Komponente $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Kombination $1,0\mu\text{g} + 2,0\mu\text{g}$ von $2,0\mu\text{g}$ auf $4,0\mu\text{g}$ schien keinen Einfluß auf die Gewichtsentwicklung, den Futterverbrauch und den Calciumspiegel im Serum auszuüben. Der Parameter Knochenasche konnte jedoch sowohl absolut, als auch relativ zur Trockensubstanz um 13% erhöht werden. Eine schlüssige Erklärung für den Mechanismus dieses synergistischen Effektes gibt es bis jetzt noch nicht. Die eigenen Untersuchungen können das Vorhandensein eines

Abb.1 CaBP-Bildung: ohne Sr - Hemmung

Werte aus:

Tab. 11

Tab. 16

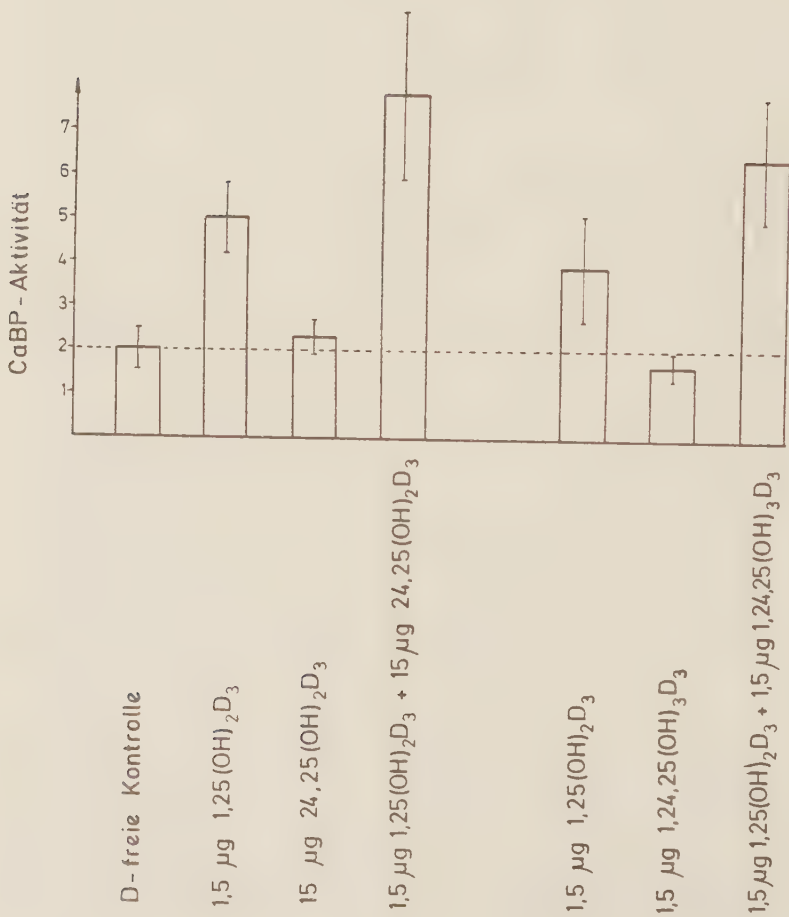
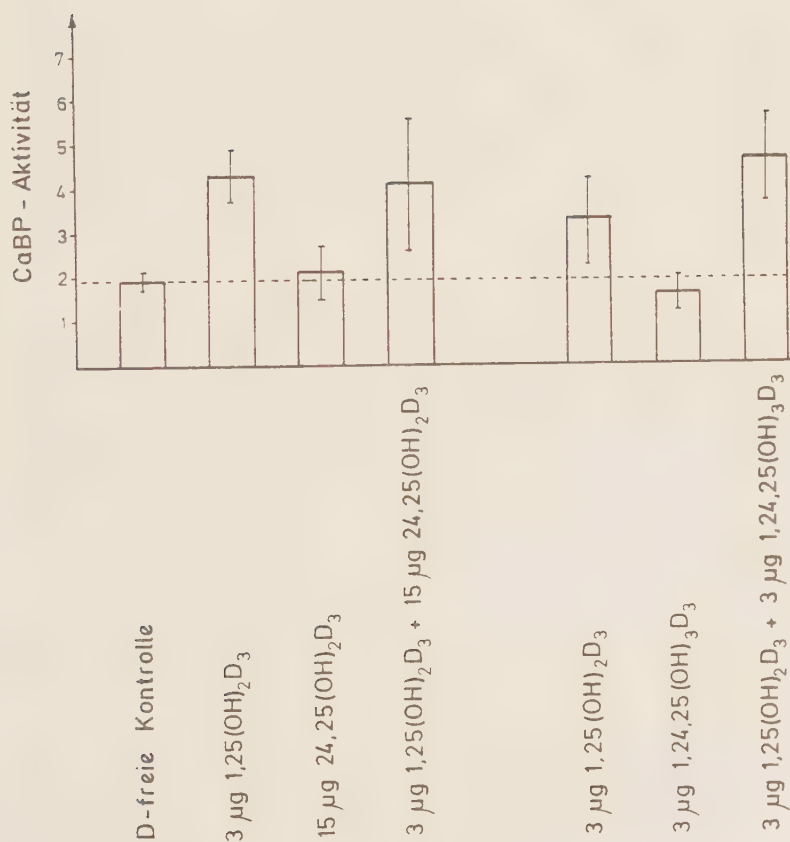


Abb.2 CaBP Bildung: mit Sr-Hemmung

Werte aus:

Tab. 16

Tab. 21



überadditiven Effektes belegen und genauer beschreiben, sie können aber keinen Hinweis auf das Zustandekommen geben. Ein möglicher Weg könnte die Verlängerung der biologischen Halbwertszeit von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sein, etwa indem $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ eine Metabolisierung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und somit die einsetzende Inaktivierung hinauszögert oder verhindert. Eine weitere Möglichkeit bestünde in der direkten Einflußnahme auf die Rezeptoren für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. In vitro konnte nachgewiesen werden, daß die Bindungsaffinität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu seinen Rezeptoren durch $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verändert werden kann. Daraus schloß man, daß am Rezeptor für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auch eine Bindungsstelle für $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bestehen könnte (WILHELM and NORMAN, 1985). Weiterhin ist auch eine Einflußnahme auf die Anzahl der zur Verfügung stehenden Rezeptoren denkbar. Nach einer Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $25(\text{OH})\text{D}_3$ zu einer Nierenzellkultur konnte die Anzahl der Rezeptorstellen für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gesteigert werden (COSTA et al., 1985; SÖMJEN et al., 1986).

Da mit einer kombinierten Verabreichung eventuell die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration gesenkt werden kann, könnte diese potenzierende Wirkung von 24-hydroxylierten Metaboliten auf die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Wirkung am Darm unter Umständen von therapeutischem Interesse sein. Dazu müßte allerdings vorher die genaue therapeutische Breite ermittelt werden und außerdem noch die Wirkung der Kombination auf das neben dem Darm wichtigste D-abhängige System, dem Knochen, untersucht werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In prophylaktischen und kurativen Testverfahren an Vitamin D-depletierten Hühnerküken wurde die antirachitische Aktivität von oral verabreichten $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$, sowie von Kombinationen aus $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, aus $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ oder von $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ untersucht.

Es zeigte sich, daß neben $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auch $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ eine synergistische Wirkung auf die durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induzierte CaBP-Synthese auszuüben vermochte. Die aktivierend wirkende Dosis für $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ lag jedoch deutlich niedriger, als für $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Während $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in einem Verhältnis von 1:10 eingesetzt wurden, ergab sich für $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ bereits eine Aktivierung bei einem Verhältnis von 1:1.

Da bei einer strontiuminduzierten Hemmung der Nierenhydroxylase die potenzierende Wirkung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, nicht aber die von $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ verloren ging, ist anzunehmen, daß für einen synergistischen Effekt von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine vorherige Umwandlung in $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ notwendig ist.

Ein überadditiver Wirkungsanstieg auf das CaBP konnte auch in der Kombination von $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ erreicht werden. Während die Wirkung von $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ verglichen mit der von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ geringer ausgeprägt war, schien in der Kombination mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ein weitaus stärker stimulierender Effekt vorzuliegen.

Die überadditive Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ am Hühnerküken konnte am deutlichsten an der CaBP-Bildung gesehen werden, jedoch wurde sie ebenfalls bezüglich der Gewichtszunahme, des Serumcalciumspiegels und des relativen

und absoluten Knochenaschegehaltes der Tibia erkennbar.

Ob diese synergistische Beeinflussung der Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durch eine Einflußnahme auf die biologische Halbwertszeit von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder auf die Rezeptoren von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hervorgerufen wird, ist ungeklärt. Eine erhöhte Wirkung 2_3 bei kombinierter Gabe dieser Vitamin D-Metabolite könnte sich aus therapeutischer Sicht als interessant erweisen.

SUMMARY

Mutual, Synergistic Effects of Vitamin D Metabolites in Rachitic Chicken.

In prophylactic and curative assays in vitamin D deficient chicks the antirachitic activity of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ as well as the combination of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ or of $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ and $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ was examined.

$1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ as well as $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ potentiated the $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induced synthesis of CaBP. This effect was highest when $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ was given in equimolar concentration to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, while $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ had to be administered in a 10 times higher concentration.

After blocking the 1α -hydroxylation of the metabolites by dietary strontium the synergistic effect on CaBP-activity disappeared in the combination of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, but not in the combination $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$. As a consequence it is assumed, that $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ produces only a synergistic effect after its hydroxylation to $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$.

Furthermore, the combination of $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ and $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ showed a synergistic effect on CaBP-activity too. Though $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ shows a weaker activity than $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, it produces an even more potent synergistic effect together with $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$.

The synergistic effect of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ in chicken was seen best in the synthesis of CaBP, but also weight gain, concentration of calcium in serum, relative and absolute bone ash content of the tibia showed this effect.

Whether this effect is due to a longer biological half-lifetime of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ or to an influence to the receptors of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ is still unsolved. An increased antirachitic effect by combined application of these vitamin D metabolites might be of therapeutical value.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- AMEENUNDIN, S., M. SUNDE, H.F. DeLUCA, N. IKEKAWA, Y. KOBAYAS (1982):
24-hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃; is it required for
embryonic development in chicks?
Science **217**, 451-452
- AVIOLI, L.V., S.J. BIRGE, S.W. LEE (1968):
Effects of prednisone on vitamin D metabolism in man.
J. Clin. Endocrinol. Metab. **28**, 1341-1346
- AVIOLI, L.V. and T.J. HAHN (1978):
Steroid-induced osteopenia.
In: Endocrinology of Calcium metabolism.
(Ed. O.H. Copp, R.V. Talmage)
Excerpta Medica, Amsterdam, **23**
- BABARYKIN, D.A., V.K. BAUMAN, M.Y. VALINIETSE, R.L. ROSENAL (1982):
Similarity and differences in 1,25(OH)₂D₃ and 24,25(OH)₂D₃
antirachitic effects.
In: Vitamin D: Chemical, biochemical and clinical endocrinology of
calcium metabolism.
(Ed. A.W. Norman, K. Schäfer, D. von Herrath, H.-G. Grigoleit)
Walter de Gruyter, Berlin / New York, 1201-1203
- BARAN, D.T. and M.L. MILNE (1983):
1,25-dihydroxyvitamin D induced inhibition of ³H-hydroxyvitamin D
production by the rachitic rat liver in vitro.
Calcif. Tissue Int. **35**, 461-464
- BAXTER, L.A. and H.F. DeLUCA (1976):
Stimulation of 25-hydroxyvitamin D₃-~~1α~~-hydroxylase by phosphate
depletion.
J. Biol. Chem. **251**, 3158-3161

BELL, N.H., S. SHAW, R.T. TURNER (1984):

Evidence that 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits the hepatic production of 25-hydroxyvitamin D₃ in man.
J. Clin Invest. **74**, 1540-1544

BERESFORD, J.N., J.A. GALLAGHER, J.W. POSER, R.G.G. RUSSELL (1984):

Production of osteocalcin by human bone cells in vitro. Effects of 1,25(OH)₂D₃, 24,25(OH)₂D₃, parathyroid hormone, and glucocorticoids.
Metab. Bone Dis. Relat. Res. **5**, 229-234

BHATTACHARYYA, M. and H.F. DeLUCA (1974):

Subcellular location of rat liver calciferol-25-hydroxylase.
Arch. Biochem. Biophys. **160**, 58-62

BIKLE, D.D. and H. RASMUSSEN (1978):

A biochemical model for the ionic control of 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase.
J. Biol. Chem. **253**, 3042-3048

BICKLE, D.D., E.M. SPENCER, W.H. BURKE, C.R. ROST (1980):

Prolactin but not growth hormone stimulates 1,25-dihydroxyvitamin D₃ production by chick renal preparations in vitro.
Endocrinology **107**, 81-84

BISHOP, C.W., N.C. KENDRICK, H.F. DeLUCA (1983):

Induction of calcium-binding protein before 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulation of duodenal calcium uptake.
J. Biol. Chem. **258**, 1305-1310

BJORKHEM, J. and J. HOLMBERG (1979):

On the 25-hydroxylation of vitamin D₃ in vitro studied with a mass fragmentographic technique.
J. Biol. Chem. **253**, 842-849

BOYLE, I.T., J.L. OMDAHL, R.W. GRAY, H.F. DeLUCA (1973):

The biological activity and metabolism of 24,25-dihydroxy-vitamin D₃.

J. Biol. Chem. 218, 4174-4180

BOUILLON, R. and H. van BAELEN (1981):

Transport of vitamin D: Significance of free and total concentrations of the vitamin D metabolites.

Calcif. Tissue Int. 33, 451-453

BROMMAGE, R., K. JARNAGIN, H.F. DeLUCA, S. YAMADA, H. TAKAYAMA (1983):

1- but not 24-hydroxylation of vitamin D is required for skeletal mineralization in rats.

Am. J. Physiol. 244, 298-304

BRUMBAUGH, P.H., M.R. HUGHES, M.R. HAUSSLER (1975):

Cytoplasmic and nuclear binding components for 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in the chick parathyroid gland.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4871-4875

BRUNETTE, M., M. CHAN, C. FERRIERE, K.D. ROBERTS (1978):

Site of 1,25(OH)₂-vitamin D₃ synthesis in the kidney.

Nature 276, 287-289

CHESNEY, R.W., R.B. MAZZES, A.J. HAMSTRA, H.F. DeLUCA, S. O'REAGAN (1978):

Reduction of serum-1,25-dihydroxyvitamin D₃ in children receiving glucocorticoids.

Lancet 2, 1123-1125

CHRISTAKOS, S. and A.W. NORMAN (1979):

Studies on the mode of action of calciferol XVIII. Evidence for a specific high affinity binding protein for 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ in chick kidney and pancreas.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 89, 56-63

CHEN, T.C., J.C. WEBER, H.F. DeLUCA (1970):

On the subcellular location of vitamin D metabolites in intestine.

J. Biol. Chem. **245**, 3776-3780

COLSTON, K.W., J.M.A. EVANS, T.C. SPELSBERG, I. McINTYRE (1977):

Feedback regulation of vitamin D metabolism by 1,25-dihydroxy-cholecalciferol.

Biochem. J. **164**, 83-89

CORRADINO, R.A. and R.H. WASSERMAN (1970):

Strontium inhibition of vitamin D₃-induced calcium-binding protein (CaBP) and calcium absorption in chick intestine.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **133**, 960-963

CORRADINO, R.A., J.G. EBEL, P.H. CRAIG, A.N. TAYLOR,

R.H. WASSERMAN (1971):

Calcium absorption and the vitamin D₃-dependent calcium-binding protein.

Calc. Tiss. Res. **7**, 81-92

COSTA, E.M., M.A. HIRST, D. FELDMAN (1985):

Regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors by vitamin D analogs in cultured mammalian cells.

Endocrinology **117**, 2203-2210

CUNDY, T., J.A. KANIS, S. PATON, R. SMITH, G.T. WARNER, M. BARTLETT, R.G.G. RUSSELL (1979):

The biological effects 1,24,25-trihydroxyvitamin D₃ in man.

Metab. Bone Dis. & Rel. Res. **1**, 295-298

DEKEL, S., R. SALAMA, S. EDELSTEIN (1983):

The effect of vitamin D and its metabolites on fracture repair in chicks.

Clinical Science **65**, 429-436

DeLUCA, H.F. (1974):

Vitamin D: The vitamin and the hormone.

Fed. Proc. **33**, 2211-2219

DeLUCA, H.F. and H.K. SCHNOES (1976):

Metabolism and mechanism of action of vitamin D.

Ann. Rev. Biochem. **45**, 631-666

DeLUCA, H.F. (1980):

The transformation of a vitamin into a hormone: The vitamin D story.

Harvey Lect., Ser. **75**, 1979-1980, 333-379

DeLUCA, H.F. and J.G. GHAZARIAN (1980):

The role of vitamin D and its metabolites in calcium and phosphate metabolism.

In: Handbuch der inneren Medizin VI / 1A, Knochen, Gelenke, Muskeln.

(Ed. F. Kuhlencordt, H. Bartelheimer)

Springer Verlag, Berlin, 173-196

DeLUCA, H.F. (1981):

Recent advances in the metabolism of vitamin D.

Ann. Rev. Physiol. **43**, 199-209

DeLUCA, H.F. and H.K. SCHNOES (1983):

Vitamin D: Recent advances.

Ann. Rev. Biochem. **52**, 411-439

DIETRICH, J.W., E.M. CANALIS, D.M. MANIA, L.G. RAISZ (1979):

Effects of glucocorticoids on fetal rat bone collagen synthesis in vitro.

Endocrinology **104**, 715-721

DUELAND, S., J.I. PEDERSEN, P. HELGERUD, C.A. DREVON (1982):

Transport of vitamin D₃ from rat intestine.

J. Biol. Chem. **257**, 146-152

EBRAHIM, G.J. (1979):

The problems of undernutrition

In: Nutrition and Disease

(Ed. R.J. Jarret)

University Park Press, Baltimore, 13-130

ENDO, H., M. KIYOKI, K. KAWASHIMA, T. NARUCHI, Y. HASHIMOTO (1980):

Vitamin D₃ metabolites and PTH synergistically stimulate bone formation of chick embryonic femur in vitro.

Nature 286, 262-264

ESVELT, R.P., H.K. SCHNOES, H.F. DeLUCA (1979):

Isolation and characterization of 1 α -hydroxy-23-carboxytetranor-vitamin D: A major metabolite of 1,25-dihydroxyvitamin D₃.

Biochemistry 18, 3977-3983

FINE, N., I. BINDERMAN, D. SOMJEN, Y. EARON, S. EDELSTEIN,

Y. WEISMAN (1985):

Autoradiographic localization of 24R,25-dihydroxyvitamin D₃ in epiphyseal cartilage.

Bone 6, 99-104

FLURY, W. und B. HALDIMANN (1981):

Therapie mit Vitamin D und D-Metaboliten.

Schweiz. med. Wschr. 111, 314-321

FRANCESCHI, R.T. and H.F. DeLUCA (1981):

Characterization of 1,25-dihydroxyvitamin D₃-dependent calcium uptake in cultured embryonic chick duodenum.

J. Biol. Chem. 256, 3840-3847

FRASER, D.R. and e. KODICEK (1970):

Unique biosynthesis by kidney of a biologically active vitamin D metabolite.

Nature 228, 764-766

FUCIK, R.F., S.C. KUKREJA, G.K. HARGIS, E.N. BOWSER, W.J. HENDERSON, G.A. WILLIAMS (1975):

Effects of glucocorticoids on function of the parathyroid glands in man.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 40, 152-155

FULLMER, C.S., M.E. BRINDAK, S. EDELSTEIN, R.H. WASSERMAN (1984):

Early and direct effect of 1,25-dihydroxycholecalciferol on calcium-uptake by duodena of rachitic chicks.

Society for Experimental Biology and Medicine 177, 455-458

GALLAGHER, J.C., B.L. RIGGS, H.F. DeLUCA (1980):

Effect of estrogen on calcium absorption and serum vitamin D metabolites in postmenopausal osteoporosis.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 51, 1359-1364

GARABEDIAN, M., M.F. HOLLICK, H.F. DeLUCA, I.T. BOYLE (1972):

Control of 25-hydroxycholecalciferol metabolism by parathyroid glands.

Proc Natl. Acad. Sci. USA 69, 1673-1676

GARABEDIAN, M., M.B. du BOIS, M.T. CORVOL, E. PEZANT, S. BALSAN (1978):

Vitamin D and cartilage. I. In vitro metabolism of 25-hydroxycholecalciferol by cartilage.

Endocrinology 102, 1262-1268

GHIJEN, W.E.J.M. and C.H. van Os (1982):

Regulation of calcium-ATPase and active calcium transport in basolateral membranes by $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in rat duodenum.

Proc. Fifth Workshop on Vitamin D, Williamsburg, VA, Feb. 14.-19., 1982, S.106

GOODMAN, W.G., D.J. BAYLINK, D.J. SHERRARD (1984):

$24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, bone formation, and bone resorption in vitamin D-deficient, azotemic rats.

Calcif. Tissue Int. 36, 206-213

GRAY, T.K., G.E. LESTER, R.S. LORENCE (1979):

Evidence for a extrarenal 1 α -hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃ in pregnancy.

Science 204, 1311-1313

HADDAD, J.G., J.R. and J. WALGATE (1976):

Radioimmunoassay of binding protein for vitamin D and its metabolites in human serum: Concentration in normal subjects and patients with disorders of mineral homeostasis.

J. Clin. Invest. 58, 1217-1222

HAHN, T.J., L.R. HALSTEAD, D.T. BARAN (1981):

Effects of short term glucocorticoid administration on intestinal calcium absorption and circulating vitamin D metabolite concentrations in man.

J. Clin. Endocrinol. metab. 52, 111-115

HALLORAN, B.P., E.N. BARTHELL, H.F. DeLUCA (1979):

Vitamin D metabolism during pregnancy and lactation in the rat.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5549-5543

HALLORAN, B.P. and H.F. DeLUCA (1981):

Intestinal calcium transport: Evidence for two distinct mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃.

Arch. Biochem. Biophys. 208, 477-486

HALLORAN, B.P., H.F. DeLUCA, E. BARTHELL, S. YAMADA, M. OHMORI, H. TAKAYAMA (1981):

An examination of the importance of 24-hydroxylation to the function of vitamin D during early development.

Endocrinology 108, 2067-2071

HAUSLER, M.R., S.C. MANALOGAS, L.J. DEFTOS (1980):

Evidence for a 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor-like macromolecule in rat pituitary.

J. Biol. Chem. 255, 5007-5010

HENRY, H.L. and A.W. NORMAN (1978):

Vitamin D: Two dihydroxylated metabolites are required for normal chicken egg hatchability.
Science 217, 835-837

HENRY, H.L. (1981):

Insulin permits parathyroidhormone stimulation of 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ production in cultured kidney cells.
Endocrinology 108, 733-736

HENRY, H.L. and A.W. NORMAN (1984):

Vitamin D: Metabolism and biological actions.
Ann. Rev. Nutr. 4, 493-520

HIRST, M. and D. FELDMAN (1982):

Glucocorticoids downregulate the number of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in mouse intestine.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 105, 1590-1596

HIWATASHI, A., Y. NISHII, Y. ICHIKAWA (1982):

Purification of cytochrome P-450_{D1 α} (25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase) of bovine kidney mitochondria.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 103, 320-327

HODSMAN, A.B., E.G.C. WONG, D.J. SHERRARD (1983):

Preliminary trials with 24,25(OH)₂D₃ in dialysis osteomalazie.
Am. J. Med. 74, 407-414

HOLLICK, M.H., A. KLEINER-BOSSALLER, H.K. SCHNOES, P.M. KASTEN,

I.T. BOYLE, H.F. DeLUCA (1973):

1,24,25-trihydroxyvitamin D₃-metabolite of vitamin D₃ effective in intestine.
J. Biol. Chem., 19, 6691-6696

HOLLICK, M.H. and M.B. CLARK (1978):

The photobiogenesis and metabolism of vitamin D.
Fed. Proc. 37, 2567-2574

HOLLICK, M.H. and H.F. DeLUCA (1978):

Metabolism of vitamin D.

In: Vitamin D

(Ed. D.E.M. Lawson)

Academic Press, New York, pp. 51-91

HOWARD, G.A., R.T. TURNER, D.J. SHERRARD, D.J. BAYLINK (1981):

Human bone cells in culture metabolize $25(\text{OH})\text{D}_3$ to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

J. Biol. Chem. **256**, 7738-7740

HUGHES, M.R., P.F. BRUMBAUGH, M.R. HAUSSLER, J.E. WERGEDAL, D.J.

BAYLINK (1975):

Regulation of serum $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 by calcium and phosphate in the rat.

Science **190**, 578-579

ISHIZUKA, S., T. TAKESHITA, A.W. NORMAN (1984):

Naturally occurring $24,25$ -dihydroxyvitamin D_3 is a mixture of both C-24R and C-24S epimers.

Arch. Biochem. Biophys. **234**, 97-104

IVANHOE, F. (1970):

Was Virchow right about Neandertal?

Nature (London), **227**, 577-579

JARNAGIN, K., R. BROMMAGE, H.F. DeLUCA, S. YAMADA, H. TAKAYAMA (1983):

1 -but not 24 -hydroxylation of vitamin D is required for growth and reproduction in rats.

Am. J. Physiol. **244**, 290-297

JONES, G., K. KANO, S. YAMADA, T. FURUSAWA, H. TAKAYAMA,

T. SUDA (1984):

Identifikation of $24,25,26,27$ -tetranor- 23 -hydroxyvitamin D_3 as a product of the renal metabolism of $24,25$ -dihydroxyvitamin D_3 .

Biochemistry **23**, 3749-3754

KANIS, J.A., R.G.G. RUSSELL, R.B. NAIK, M. EARNSHAW, R. SMITH,
G. HAGEN, C.G. WOODS (1977):

Factors influencing the response to 1-hydroxyvitamin D_3 in
patients with renal bone disease.

Clin. Endocrin. 7 (Suppl.), 51s-57s

KANIS, J.A., D. GUILLAND-CUMMING, A.D. PATERSON,
R.G.G. RUSSELL (1982):

The role of $1,25(OH)_2D_3$ and $24,25(OH)_2D_3$ in calcium
homeostasis

In: Vitamin D: Chemical, biochemical and clinical endocrinology
of calcium metabolism.

(Ed. A.W. Norman, K. Schäfer, D. von Herrath, H.-G. Grigoleit)

Walter de Gruyter, Berlin / New York, 157-167

KAWASHIMA, H., S. TORIKAI, K. KUROKAWA (1981):

Calcitonin selectively stimulates 25-hydroxyvitamin D_3 - 1α -
hydroxylase in proximal straight tubule of rat kidney.

Nature 291, 327-329

KOWARSKI, S. and D. SCHACHTER (1981):

Intestinal membrane calcium-binding protein. Vitamin D dependent
membrane component of the intestinal calcium transport mechanism.

J. Biol. Chem. 255, 10834-10840

KREMER, R. and D. GOLTZMAN (1982):

Parathyroid hormone stimulates mammalian renal 25-hydroxyvitamin
 D_3 - 1α -hydroxylase in vitro.

Endocrinology 110, 294-296

KRUSE, H.-P., F. KUHLENCORDT (1980):

Osteomalazie.

In: Handbuch der inneren Medizin.

(Ed. F. Kuhlencordt, H. Bartelheimer)

Springer, Berlin-Heidelberg-New York, Bd. 6, Teil 1 B, S. 751

KRUSE, H.-P., F. KUHLENCORDT (1982):

Erkrankungen der Nebenschilddrüsen.

In: Rationelle Diagnostik in der inneren Medizin.

(Ed. H. Losse, E. Wetzels)

Thieme, Stuttgart, 3. Auflage, S. 214

KRUSE, H.P. (1985):

Behandlung mit Vitamin D, D-Hormonen und synthetischen Analogen.

Dtsch. med. Wschr., 110, 66-70

KUGAI, N., Y. KOIDE, S. KIMURA, K. YAMASHITA, E. OGATA (1981):

Inhibitory effects of $1\alpha,25$ -dihydroxycholecalciferol on parathyroid hormone secretion in rats.

Endocrinol. Jpn. 28, 653-661

KUMAR, R., D. HARNDEN, H.F. DeLUCA (1976):

Metabolism of $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 : Evidence for a site chain oxidation.

Biochemistry 15, 2420-2423

KUMAR, R., D. HARNDEN, H.F. DeLUCA (1978):

Rat intestinal 25 -hydroxyvitamin D_3 - and $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 - 24 -hydroxylase.

J. Biol. Biochem. 253, 3804-3809

KUMAR, R., S. NAGUBANDI, J.M. LONDOWSKI (1980):

Enterohepatic physiology of $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 .

J. Clin. Invest. 65, 277-284

LLACH, F., A.S. BRICKMAN, J.W. COBURN (1980):

Unique effects of $24,25$ -dihydroxyvitamin D_3 in uremic patients.

Contrib. Nephrol. 18, 212-217

LOWRY, O.H., N.J. ROSENBROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL (1951):

Protein measurement with folin phenol reagent.

J. Biol. Chem. 193, 265-275

LUND, J. and H.F. DeLUCA (1966):

Biological active metabolite of vitamin D_3 from bone, liver, and blood serum.

J. Lipid Res., 7, 739-744

MAWER, E.B. (1982):

Functional control over the metabolic activation of calciferol.

In: Endocrinology of calcium metabolism.

(Ed. J.A. Parsons)

Raven Press, New York, 271-295

McCOLLUM, E.V., N. SIMONDS, J.E. BECKER et al. (1922):

Studies on experimental rickets. XXI. An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition.

J. Biol. Chem. 53, 293-312

MEZZETTI, G., M.S. MORUZZI, B. BABIROLI (1981):

Evidence for a 1,25-dihydroxyvitamin D_3 dependent spermine binding protein in chick duodenal mucosa.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 102, 287-294

NAPOLI, J.L., B.G. PRAMANIK, J.J. PARTRIGDE, M.R. USKOKOVIC,

R.L. HORST (1982):

23S,25-dihydroxyvitamin D_3 as a circulating metabolite of vitamin D_3 . Its role in 25-hydroxyvitamin D_3 -26,23-lactone biosynthesis.

J. Biol. Chem. 257, 9634-9639

NARBAITZ, R., M. SAR, W.E. STUMPF, S. HUANG, H.F. DeLUCA (1981):

1,25-dihydroxyvitamin D_3 target cells in rat mammary gland.

Horm. Res. 15, 263-269

NIELSEN, H.E., I.K. ROMER, F. MELSEN, M.S. CHRISTENSEN,

H.E. HANSEN (1980):

1-hydroxyvitamin D₃ treatment of non-dialyzed patients with chronic renal failure. Effects on bone, mineral metabolism and kidney function.

Clin. Nephrol. 13, 103-108

NITSCHKE, H. (1980):

Bestimmung der Aktivität des duodenalen calciumbindenden Proteins als Parameter Vitamin D-artiger Wirkung.

Vet. Med. Diss., München

NORMAN, A.H., H.L. HENRY, H.H. MALUCHE (1980):

24R,25-dihydroxyvitamin D₃ and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ are both indispensable for calcium and phosphorus homeostasis.

Life Sciences 27, 229-237

NORMAN, A.W., J. ROTH, L. ORCI (1982):

The vitamin D endocrine system: Steroid metabolism, hormone receptors, and biological response (calcium binding proteins).

Endocrine Reviews 3, 331-366

NORMAN, A.W., V.L. LEATHERS, J.E. BISHOP, C. KADOWAKI, B.E. MILLER (1982):

24R,25-dihydroxyvitamin D₃ has unique receptors (Parathyroid gland) and biological responses (Egg hatchability).

In: Vitamin D: Chemical, Biochemical and Clinical Endocrinology of calcium metabolism.

(Ed. A.W. Norman, K. Schäfer, D. v. Herrath, H.-G. Grigoleit)

Walter de Gruyter, Berlin / New York, S.147-151

NORMAN, A.W., V. LEATHERS, J.E. BISHOP (1983):

Normal egg hatchability requires the simultaneous administration to the hen of 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol and 24R,25-dihydroxycholecalciferol.

J. Nutr. 113, 2505-2515

OMDAHL, J.L. and H.F. DeLUCA (1972):

Rachitogenic activity of dietary strontium. Inhibition of intestinal calcium absorption and 1,25-dihydroxycholecalciferol synthesis.

J. Biol. Chem. **247**, 5520-5526

PARFITT, A.M., C.H.E. MATHEWS, R. BROMMAGE, K. JARNAGIN, H.F. DeLUCA (1984):

Calcitriol but no other metabolite of vitamin D is essential for normal bone growth and development in the rat.

J. Clin. Invest. **73**, 576-586

PARTRIDGE, J.J., S.J. SHIUEY, N.K. CHADHA, E.G. BAGGIOLINI, P.N.

CONFALONE, J. KULESHA, P. WOWKULICH, M.R. USKOKVIC, R. BARMER (1981):

Synthesis and structure proof of a vitamin D metabolite, 25S,26-dihydroxycholecalciferol.

In: Osteoporosis: Recent advances in pathogenesis and treatment.

(Ed. H.F. DeLuca, H.M. Frost, W.S.S. Log, C.C. Johnston, A.M. Parfitt)

University Park Press, Baltimore, S. 487

PEDERSEN, J.I., I. HOLMBERG, I. BJORKHEM (1979):

Reconstitution of vitamin D₃-25-hydroxylase activity with a cytochrom P-450 preparation from rat liver mitochondria.

FEBS Lett. **98**, 394-398

PIKE, J.W., J.B. PARKER, M.R. HAUSSLER, A. BOASS, S.U. TOWERND (1979):

Dynamic changes in circulating 1,25-dihydroxyvitamin D during reproduction in rats.

Science **204**, 1427-1429

PRICE, P.A. and S.A. BANKOL (1981):

1,25-dihydroxyvitamin D₃ increases serum levels of the vitamin K-dependent bone protein.

Biochem. Biophys. Res. Comm. **99**, 928-935

- RAISZ, L.G., C.L. TRUMMEL, M.F. HOLLICK, H.F. DeLUCA (1972):
1,25-dihydroxycholecalciferol: A potent stimulator of bone
resorption in tissue culture.
Science **175**, 768-769
- RAISZ, L.G. (1981):
Calcium regulation.
Clin. Biochem. **14**, 209-212
- RAMBECK, W.A., R. GORALCZYK, C. TRÖGER, H. ZUCKER (1985):
Synergistic effects of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in
rachitic chicks.
In: Vitamin D: A chemical, biochemical and clinical update.
(Ed. A.W. Norman, K. Schäfer, H.-G. Grigoleit, D. von Herrath)
Walter de Gruyter, Berlin / New York, 298-299
- RAMBECK, W.A. and H. ZUCKER (1985):
Synergistic effects of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on
duodenal CaBP in rachitic chicks and on eggshell weight
in japanese quails.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **126**, 799-804
- RASMUSSEN, H., T. MATSUMOTO, O. FONTAINE, D.B.P. GOODMAN (1982):
Role of changes in membrane lipid structure in the action of
 $1,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$.
Fed. Proc. **41**, 72-77
- REDDI, A.H. and S. WIENTROUB (1985):
Collaboration between $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in
the regulation of enchondral bone development.
In: Vitamin D: Chemical, Biochemical and Clinical Update.
(Ed. A.W. Norman, K. Schäfer, H.-G. Grigoleit, D. v. Herrath)
Walter de Gruyter, Berlin / New York, 1174-1180
- REDDY, G.S., G. JONES, S.W. KOCH, D. FRASER (1982):
Inhibition of $25\text{-hydroxyvitamin D}_3\text{-1-hydroxylase}$ by chronic
metabolic acidosis.
Am. J. Physiol. **243**, 265-271

REEVE, C., Y. TANAKA, H.F. DeLUCA (1983):

Studies on the site of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ synthesis in vivo.

J. Biol. Chem. 258, 3615-3617

REINHARDT, T.A., J.L. NAPOLI, B. PRAMANI, E.T. LITTELDIKE,

D.C. BEITZ, J.J. PATRIGDE, M.R. USKOKOVIC, R.L. HORST (1981):

1 α ,25,26-trihydroxyvitamin D₃: An in vivo and in vitro metabolite of vitamin D₃.

Biochemistry 20, 6230-6235

REINHARDT, T.A., R.L. HORST, E.T. LITTELDIKE, D.C. BEITZ (1982):

1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in bovine thymus gland.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 106, 1012-1018

RODAN, G.A. and S.B. RODAN (1984):

Hormone adenylate cyclase coupling in osteosarcoma clonal cell lines.

Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res. 17, 127-134

SCHAADT, O. and H. BOLER (1978):

Loss of bone mineral in axial and peripheral skeleton in aging, prednisone treatment and osteoporosis.

In: Noninvasive bone measurements: Methodological Problems.

(Ed. J. Dequeker, C.C.J. Johnston)

JRL Press, Oxford / Washington DC, 207

SCHMID, A. (1961):

Über Gesetzmäßigkeiten des Strontium-Stoffwechsels im Skelett und den Mechanismus der "Fixierung" von Strontium im Knochensystem.

Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiol. Chemie 326, 177-196

SHINKI, T., N. TAKAHASHI, C. MIYAUURA, K. SAMEJIMA, Y. NISHII,

T. SUDA (1981):

Ornithine decarboxylase activity in chick duodenum induced by

1 α ,25-dihydroxycholecalciferol.

Biochem. J. 195, 685-690

SHINKI, T., N. TAKAHASHI, T. KADOFUKUS, T. SATO, T. SUDA (1985):

Induction of spermidine N'-acetyl transferase by $1\alpha,25$ -dihydroxy-vitamin D_3 as an early common event in the target tissues of vitamin D.

J. Biol. Chem. **260**, 2185-2190

Sigma Tech. Bulletin, No. 246 (1-82)

SILVER, J., J. ZIMMERMAN, J. SELA, D. RUBINGER, M.M. FRIEDLAENDER, M.M. POPOVTZER (1984):

24,25-dihydroxycholecalciferol treatment of osteomalazia: Use in a patient with vitamin D deficiency and hyperparathyroidism.

Isr. J. Med. Sci. **20**, 437-439

SIMPSON, R.U., R.T. FRANCESCHI, H.F. DeLUCA (1980):

Characterization of a specific, high affinity binding macromolecule for $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 in cultured chick kidney cells.

J. Biol. Chem. **255**, 10160-10166

SOBEL, A.E., J. COHEN, B. KRAMER (1935):

The nature of the injury to the calcifying mechanism in rickets due to strontium.

Biochem. J. **29**, 2640-2645

SOMJEN, D., Y. WEISMAN, E. BERGER, A. HARELL, A.M. KAYE, I. BINDERMAN (1986):

The role of $24,25(OH)_2D_3$ in the maturation of rat kidney Endocrinology (in press)

SPANOS, E., D. BARRETT, J. McINTYRE, J.W. PIKE, E.F. SAFILIAN, M.R. HAUSSLER (1978):

Effect of growth hormone on vitamin D metabolism.

Nature **273**, 246-247

STANBURY, S.W. (1981):

Vitamin D and hyperparathyreodism. The lumlean lecture.

J. R. Coll. Physicians Lond. **15**, 205-217

STRÖDER, J. and P. KASAL (1970):

Evaluation of phagocytosis in rickets.

Acta Paediat. Scand. **59**, 288-292

TANAKA, Y. and H.F. DeLUCA (1971):

Bone mineral mobilization activity of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a metabolite of vitamin D.

Arch. Biochem. Biophys. **146**, 574-578

TANAKA, Y., H.F. DeLUCA, N. IKEKAWA, M. MORRISAKI, N. KOIZUMI (1975):

Determination of stereochemical configuration of 24-hydroxyl groups of 24,25-dihydroxyvitamin D₃ and its biological importance.

Arch. Biochem. Biophys. **170**, 620-626

TANAKA, Y., L. CASTILLO, H.F. DeLUCA (1977):

The 24-hydroxylation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃.

J. Biol. Chem. **252**, 1421-1424

TANAKA, Y., L. CASTILLO, M.J. WINELAND, H.F. DeLUCA (1978):

Synergistic effect of progesterone, testosterone, and estradiol in the stimulation of chick renal 25-hydroxyvitamin D₃-1-hydroxylase.

Endocrinology **103**, 2035-2039

TANAKA, Y., R.M. SHEPARD, H.F. DeLUCA, H.K. SCHNOES (1978):

The 26-hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃ in vitro by chick renal homogenates.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **83**, 7-13

TANAKA, Y., B. HALLORAN, H.K. SCHNOES, H.F. DeLUCA (1979):

In vitro production of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by rat placental tissue.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 5033-5035

TANAKA, Y., H.F. DeLUCA, Y. KOBAYASHI, T. TAGUCHI, N. IKEKAWA, M. MORISAKI (1979):

Biological activity of 24,24-difluoro-25-hydroxyvitamin D₃.
J. Biol. Chem. **254**, 7163-7167

TANAKA, Y., H.K. SCHNOES, C.M. SMITH, H.F. DeLUCA (1981):

1,25,26-trihydroxyvitamin D₃: Isolation, identification and biological activity.
Arch. Biochem. Biophys. **210**, 104-109

TANAKA, Y., E. ABE, C. MIYAURA, T. KURIBAYASHI, K. KONNO et al. (1982):

1 α ,25-dihydroxycholecalciferol and a human myeloid leukaemia cell line (HL-60).
Biochem. J. **204**, 713-719

TRECHSEL, U., J.-P. BONJOUR, H. FLEISCH (1979):

Regulation of the metabolism of 25-hydroxyvitamin D₃ in primary cultures of chick kidney cells.
J. Clin. Invest. **64**, 206-217

TSANG, R.C. (1983):

Editorial: 24,25-dihydroxyvitamin D₃: A metabolite of vitamin D in search of a function.
J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. **2**, 581-584

TURNER, R.T., J.E. PUZAS, M.D. FORTE, G.E. LESTER, T.K. GRAY, G.A. HOWARD, D.J. BAYLINK (1980):

In vitro synthesis of 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol and 24,25-dihydroxycholecalciferol by isolated calvarial cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 5720-5724

WALLING, M.W., D.L. HARTENBOWER, J.W. COBURN, A.W. NORMAN (1977):

Effects of 1 α ,25-, 24R,25-, and 1 α ,24R,25-hydroxylated metabolites of vitamin D₃ on calcium and phosphate absorption by duodenum from intact and nephrectomized rats.
Arch. Biochem. Biophys. **182**, 251-257

WALTERS, M.R., D.M. ROSEN, A.W. NORMAN, R.A. LUBEN (1982):

1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in an established bone cell line.

J. Biol. Chem. 257, 7481-7484

WASSERMAN, R.H., R.A. CORRADINO, A.N. TAYLOR (1968):

Vitamin D-dependent calcium-binding protein. Purification and some properties.

J. Biol. Chem. 243, 3978-3986

WASSERMAN, R.H., M.E. Brindak, S.A. MEYER, C.S. FULLMER (1982):

Evidence for multiple effects of vitamin D₃ on calcium absorption: Response of rachitic chicks, with or without partial vitamin D₃ repletion, to 1,25-dihydroxyvitamin D₃.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7939-7943

WASSERMAN, R.H. and C.S. FULLMER (1983):

Calcium transport proteins, calcium absorption, and vitamin D.

Am. Rev. Physiol. 45, 375-390

WEBER, J.C., V. PONS, E. KODICEK (1971):

The localisation of 1,25-dihydroxycholecalciferol in bone cell nuclei of rachitic chicks.

Biochem. J. 125, 147-153

WECKSLER, W.R., R.S. MASON, A.W. NORMAN (1979):

Specific cytosol receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human intestine.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 48, 715-717

WICHMAN, J.K., H.K. SCHNOES, R.L. HORST, R.M. SHEPARD, N.A.

JORGENSEN (1979):

25-hydroxyvitamin D₃-26,25-lactone: A new in vivo metabolite of vitamin D.

Biochemistry 18, 4775-4780

WILHELM, F. and A.W. NORMAN (1985):

24R,25-dihydroxyvitamin D₃ regulates 1,25-dihydroxyvitamin D₃
binding to its chick intestinal receptor.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 126, 496-501

WINDAUS, A., F. SCHENCK, F. WERDER (1936):

Über das antirachitisch wirksame Bestrahlungsprodukt aus
7-dehydro-cholesterin.

Hoppe Seylers 2 Physiol. Chem. 241, 100-103

YETGIN, S. and S. OZSOYLU (1982):

Myeloid metaplasia in vitamin D deficiency rickets.

Scand. J. Haematol. 28, 180-185

YOON, P.S. and H.F. DeLUCA (1980):

Resolution and reconstitution of soluble components of rat liver
microsomal vitamin D₃-25-hydroxylase.

Arch. Biochem. Biophys. 203, 529-541

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. H. Zucker danke ich herzlich für die Oberlassung des Themas.

Ganz besonders gilt mein Dank Herrn Dr. rer. nat. Dr. med. vet. habil. W.A. Rambeck für seinen gerne gewährten Rat bei der Planung und Durchführung dieser Arbeit.

Gleichfalls möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung der Versuche unterstützt haben, dies gilt insbesondere für Frau A. Wetzel und Frau A. Bachhuber, sowie den Kollegen und Kolleginnen M. Kopp, H.-G. Pflüger, K. Metz, M. Völk, J. Mohn, F. Schweigert, W. Eisele, R. Hettich, G. Geyer und S. Meier.

Für die Unterstützung bei der statistischen Aufarbeitung der Ergebnisse danke ich Herrn H. Fischer.

Mein Dank gilt auch dem Tierpflegepersonal der Abteilung am Oberwiesenfeld für die entgegenkommende Hilfe und Beratung.

Abschließend möchte ich noch auf die sehr guten Arbeitsbedingungen am Institut hinweisen.

LEBENS LAUF

Bernd, Alfred Wicklein

- 25.11.1958 in Haarbrücken geboren (Krs. Coburg)
Vater : Ernst Wicklein; Arbeiter
Mutter: Isolde Wicklein, geb. Suffa; Hausfrau
- 1965-1969 Besuch der Volksschule Haarbrücken
- 1969-1978 Besuch des Arnold-Gymnasiums, Neustadt bei Coburg
- 30.06.1978 Abitur
- Okt.1978-Dez.1979 Grundwehrdienst
- WS 79/80-WS 84/85 Studium der Tiermedizin an der L-M-U München
- 08.11.1984 Abschluß des Staatsexamen
- 18.01.1985 Approbation als Tierarzt
- Dez.1984 Beginn der Arbeiten an der vorliegenden Dissertation
- Mai 1985-Okt.1985 Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut
für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungs-
physiologie der Tierärztlichen Fakultät der L-M-U
München

